

RHEOLOGISCHES VERHALTEN
ENZYMBEHANDELTER ERYTHROZYTEN

Hans Georg Schachtner

1975



Digitized by the Internet Archive
in 2026

https://archive.org/details/IA41551907_0057

Aus dem Physiologischen Institut der Universität München

Vorstand: Prof. Dr. KRAMER

RHEOLOGISCHES VERHALTEN

ENZYMBEHANDELTEN ERYTHROZYTEN

Inaugural-Dissertation

zur Erlangung der Doktorwürde in der Zahnheilkunde
an der Ludwig Maximilians-Universität zu München

vorgelegt von

Hans Georg Schachtner

aus

Kempten

Jahr

1975

Mit Genehmigung der Medizinischen Fakultät der
Universität München

Berichterstatter:	Prof. Dr. Schmid-Schönbein
Mitberichterstatter:	Prof. Dr. Ruhenstroth-Bauer
Dekan:	Prof. Dr. Spann

Tag der mündlichen

Prüfung: 10.6.1975



INHALTSVERZEICHNIS

EINLEITUNG

I.	<u>GRUNDLAGEN DER ELEKTROPHORESE</u>	4
1.	Typen von Elektrophoresekamern	6
2.	Messung der Viskosität	7
3.	Versuchsmaterialien	7
4.	EDTA- und Citratblut	9
II.	<u>DURCHFÜHRUNG DER VERSUCHE</u>	10
1.	Durchschnittswerte und Streuung	10
2.	Klärung der Streuung	11
3.	Mögliche Gründe der Streuung	13
III.	<u>MESSUNG DES AGGREGATIONSVERHALTENS VON ERYTHROZYTEN</u>	15
1.	Scherungsresistenz der Aggregate	15
2.	Bestimmung der Halbwertszeit	16
3.	Strömungsverhalten von Erythrozytenaggregaten bei langsamer Strömung	16
4.	Quantifizierung des Ausmaßes der Aggregation bzw. der Zellorientierung	18
IV.	<u>ERGEBNISSE</u>	19
1.	Elektrophoretische Beweglichkeit	19
2.	Auswirkungen auf die Aggregation in Plasma	21
3.	Auswirkung auf die Viskosität von Erythrozytensuspensionen	27
4.	Suspensionen von enzymbehandelten Zellen in Dextranlösungen bzw. Dextran-Plasmagemischen	29
5.	Auswirkung der Enzymbehandlung auf die Verformbarkeit der Erythrozyten	36
V.	<u>DISKUSSION</u>	37
	<u>ZUSAMMENFASSUNG</u>	46
	<u>ANHANG</u>	47
	<u>LITERATURVERZEICHNIS</u>	48
	<u>LEBENS LAUF</u>	53

EINLEITUNG

Die sogenannte Hämorheologie ist eine verhältnismäßig junge Wissenschaft, die sich mit dem Fließverhalten des Blutes befaßt. Dieses Fließverhalten bestimmt zwar die Blutströmung in allen Gefäßen, jedoch hat es eine besondere Bedeutung für den Durchsatz des Blutes durch die Gefäße der Endstrombahn mit Gefäßdurchmessern zwischen 5 und 100 μm .

Das altbekannte Phänomen der Erythrozytenaggregation hat durch die moderne Hämorheologie eine neue Bedeutung gewonnen: vielfache Untersuchungen haben eindeutig gezeigt, daß die reversible Aggregation von Erythrozyten in Rouleaux bzw. sekundäre Netzwerke für die Zunahme der scheinbaren Blutviskosität bei langsamer Strömung verantwortlich ist. Auch diese Zunahme ist völlig reversibel, sie kann jedoch unter bestimmten Bedingungen soweit ansteigen, daß das Blut trotz endlicher einwirkender Kräfte nicht mehr fließt, d.h. mindestens funktionell Eigenschaften eines Festkörpers annimmt (40). Es ist durchaus denkbar, daß dieses Phänomen für die Störung der Mikrozirkulation verantwortlich ist, welche bei verschiedenen allgemeinen oder lokalen Kreislaufstörungen gefunden wird und welche seit Alters her mit den Begriffen "Stase" beschrieben wird.

Es ist sehr notwendig, auf die Reversibilität dieses Prozesses hinzuweisen, welche sich sowohl in vivo als auch in vitro bei Viskositätsmessungen zeigen läßt. Unter der Einwirkung normal hoher, vor allem gesteigerter Strömungskräfte sind die einzelnen Erythrozyten dispergiert. Sie können dann auf verschiedene Weise an der Strömung teilnehmen, z.B. durch eine Art "Panzerkettenrotation" bei Strömung des Erythrozyten in großen Gefäßen oder weitlumigen Viskosimetern oder durch stromlinienförmige Anpassung der Erythrozyten in sehr feinen Kapillaren (19,39,40,41). Durch diese Strömungsanpassung ist die Viskosität der sehr konzentrierten Aufschwemmung "Blut" trotz eines Hämatokritwertes zwischen 45 und 50 % ungewöhnlich gering, wenn man sie mit derjenigen nicht biologischer Suspensionen vergleicht. In vieler Hinsicht ist das Verhalten des Erythrozyten dem eines Flüssigkeitstropfens analog (18, 47), seine Fluidität ist auch verantwortlich für das Phänomen des Plasmaskimming, der Axial-

migration und schließlich des sogenannten FAHRAEUS-LINDQVIST-Effekts, d.h. die Abnahme der scheinbaren Blutviskosität in schnell durchströmenden Röhren mit einem Durchmesser unter 300 μ (40). Alle diese vorteilhaften Eigenschaften des Erythrozyten kann er jedoch nur entfalten, wenn die Strömungskräfte so groß sind, daß sie die physiologischerweise in Stase vorhandene Aggregation aufheben. Dies ist umso leichter, je geringer die adhäsiven Kräfte zwischen den Erythrozyten oder je höher die dispergierenden Kräfte der Strömung. Es genügt indes nicht, lediglich die dispergierenden Kräfte zu quantifizieren, sondern darüber hinaus müssen die adhäsiven Kräfte gemessen werden. Dies gelingt in vitro dadurch, daß mit photometrischen Methoden derjenige Schergrad gemessen wird, bei welchem die Aggregate dispergiert werden und sich die einzelnen Zellen in der Strömung ausrichten. Zu diesem Zweck sind eine Reihe von Strömungskammern mit photometrischer Registrierungsmöglichkeit vorgestellt worden (z.B. v. GÖSEN (42), KLOSE, siehe dort ausführliche Besprechung der relevanten Literatur (22, 46)). Mit solchen Geräten gelingt es, das Verhalten der Aggregate unter zwar künstlichen, aber genau definierbaren Strömungsbedingungen zu messen.

Seit langem wird die Aggregation von Erythrozyten in Beziehung gesetzt zu ihrem Oberflächen- oder Zetapotential. Über dieses Thema wurde im Jahre 1972 ein Symposium auf der Tagung der Europäischen Gesellschaft für Mikrozirkulation abgehalten und dort der gegenwärtige Stand des Wissens zusammengefaßt (9, 10, 21, 56).

Die in diesem Symposium referierten Arbeiten verwendeten mit einer Ausnahme (56) lediglich subjektive Kriterien zur Quantifizierung der Aggregation, teilweise viskometrische Methoden (9, 10, 21), deren Interpretation nicht immer einfach ist (40).

Ziel der vorliegenden Arbeit war es daher, mit den jetzt zur Verfügung stehenden mikrorheologischen Methoden den Zusammenhang zwischen Zetapotential und Fließeigenschaften von Erythrozytenaggregaten erneut zu untersuchen. Zu diesem Zweck wurde das Zetapotential mittels proteolytischer Enzyme verändert und die Aggregation in natürlichen und künstlichen Medien gemessen. Zusätzlich wurde die Viskosität der Suspension sowie die Verform-

barkeit der behandelten und unbehandelten Erythrozyten untersucht.

Unter normalen Bedingungen sind alle bisher untersuchten Blutzellen, aber auch alle Plasmaproteine negativ geladen. Die negative Ladung der Erythrozyten ist normalerweise recht konstant, aus Messungen der elektrophoretischen Beweglichkeit läßt sich ein Zetapotential (siehe unten) von ca. -14 mVolt errechnen. Da auch die Innenfläche der Gefäßwände, d.h. die Oberfläche der Endothelzellen negativ geladen sind, dürfte die gegenseitige Abstoßung ein Co-Faktor in der Ausbildung einer zellfreien Randschicht sein und damit den Blutfluß, vor allem in den Gefäßen der Mikrozirkulation erleichtern. Die Tatsache, daß lediglich negativ geladene Zellen in zirkulierendem Blut gefunden werden, muß allerdings auch als Folge eines Selektionsprozesses verstanden werden. DANON und Mitarbeiter argumentieren, daß die Abnahme der Oberflächenladung ein Faktor ist, der dafür verantwortlich ist, daß gealterte Blutzellen aus der Zirkulation entfernt werden (26,58). Da bei physiologischem pH alle Proteine in anionischer Form vorliegen, wäre es kaum denkbar, daß positiv geladene Partikel sich im Kreislauf halten könnten.

Wie bekannt, sind protoelytische Enzyme in der Lage, einen Teil der Zelloberflächenladung abzudauen. Dadurch wird in komplizierter Weise in die verschiedenen Zellaggregations- und Agglutinationsphänomene eingegriffen, z.B. steigert sich die Zellagglutination mit inkompletten Antikörpern (POLLACK) (32). Nun werden zwar normalerweise im Blut kreisende Enzyme durch Plasmainhibitoren inaktiviert, es lassen sich aber pathologische Zustände denken, in denen dieser Mechanismus überfordert wird, z.B. akute Pankreatitis. Außerdem läßt sich vorstellen, daß im Bereich ausgedehnter Verletzungen mit Gewebszerfall und länger andauernden Zirkulationsstörungen oder Unterbrechungen dieser Hemmechanismus ausfällt. Dies ist besonders dann denkbar, wenn zerfallende Bakterien ihre Enzyme freisetzen und diese dann auf statische Erythrozyten einwirken. Dann wäre es durchaus denkbar, daß durch enzymatische Vorgänge der Erythrozyt in seinem Aggregationsverhalten und damit in seiner Fließfähigkeit beeinflusst wird und dadurch lokale Zirkulationsstörungen im Bereich der Endstrombahn verstärkt würden.

I. GRUNDLAGEN DER ELEKTROPHORESE

Die Elektrophorese, d.h. die Wanderung elektrisch geladener gelöster Teilchen im elektrischen Feld, wird zu analytischen und präparativen Zwecken vielfach in der Biologie angewandt. Aus Richtung und Geschwindigkeit der Wanderung, welche meßbar sind, wird in analytischen Versuchen ein Rückschluß auf die Natur der elektrischen Grenzschicht in der Peripherie von Makromolekülen oder Zellen gezogen. Man stellt sich vor, daß eine Zelle, die in ihrer Peripherie einen Ladungsüberschuß - etwa durch ionisierte Carboxylgruppen membranständiger Proteide aufweist, in salinem Milieu umgeben ist von einer Doppelschicht von orientierten Ionenpaaren; deren Konzentration ist maximal groß in unmittelbarer Nähe der Zellmembran und nimmt exponentiell mit der Entfernung vom Sitz der Ladungen ab. (20, 24)

Über die genaue Natur der geladenen Membran, die Anordnung zu den Gegenionen und die genaue Abhängigkeit zwischen Wanderungsgeschwindigkeit und Größe der Grenzflächenladung bestehen keine einheitlichen Vorstellungen. Im allgemeinen wird davon . ausgegangen, daß eine Schicht von Gegenionen fest mit der Ladung verbunden ist und daß erst außerhalb davon die Teilchen des Lösungsmittels frei beweglich sind: die sogenannte "plane of shear" bezeichnet die Grenzschicht zwischen fest gebundenen und freien Ladungen. Unter dem sogenannten Zetapotential versteht man die Ladung in dieser Ebene (4, 32, 49).

Die Beziehung zwischen der echten Oberflächenladungsdichte und dem in dieser Grenzschicht wirkenden Zetapotential hängt u.a. ab von der Ionenstärke, der Dielektrizitätskonstanten D , dem Abstand von der Grenzfläche, sowie der absoluten Temperatur. Auch diese Beziehung ist im Detail unbekannt. Es hat indes mehrere Versuche gegeben, diese Beziehung auch mathematisch zu formulieren. Diese Problematik, welche in biologischen Membranen noch dadurch kompliziert wird, daß die Grenzfläche für Ionen durchlässig ist, ist von HAYDON (20) abgehandelt worden.

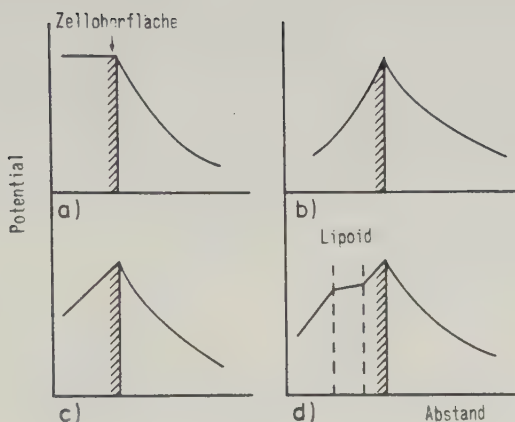


Abb. 1

Mögliche Potentialverteilung in der Region der Zelloberfläche (2c).

Die Beziehung Zetapotential zu Oberflächenladung ist abhängig von der Oberflächenstruktur der Zelle. Es ist aber fast unmöglich, für diese Beziehung ein richtiges Modell auszuwählen. Nur wenn die Oberfläche für die Gegenionen undurchdringbar ist und innerhalb der Oberfläche keine Ionen sind, besteht eine Potentialverteilung nach Abb. 1 a).

Es konnte nicht Ziel der vorliegenden Abhandlung sein, den ungelösten Beziehungen zwischen wahrer Oberflächenladung und dem umgebenden Ionenmilieu nachzugehen. Ein wirkliches Verständnis der Zelladhäsionsphänomene in kolloidalem Milieu wird sicherlich erst möglich sein, wenn nähere Informationen über die Topographie der Zellmembran sowie den Beziehungen zwischen adhärenen Makromolekülen und den Gegenionen des Suspensionsmediums vorliegen (siehe auch CHIEN 1972).

Vernachlässigt man die Details der Beziehungen zwischen Oberflächenpotential und der Umgebung und begnügt sich mit dem Begriff des Zetapotentials, so läßt sich dieses leicht aus der gemessenen elektrophoretischen Beweglichkeit (E.B.) berechnen;

da nach HELMHOLTZ und SMOLUCHOWSKI:

$$v = \frac{u}{X} = \frac{\zeta \cdot D}{4\pi \cdot \eta} \quad \left[\frac{\mu\text{m} \cdot \text{sec}^{-1} \cdot \text{V}^{-1} \cdot \text{cm}}{1} \right]$$

v = elektrophoretische Beweglichkeit

(HELMHOLTZ-
SMOLUCHOWSKI)
(1)

u = Geschwindigkeit ($\mu\text{m}/\text{sec}$)

X = elektrische Feldstärke (V/cm)

ζ = Zetapotential

D = Dielektrizitätskonstante des Mediums

η = Viskosität des Mediums

Diese Gleichung gilt - mit bestimmten Voraussetzungen - für Bakterien und Zellen ($\phi > 10^4 \text{ \AA}$) unabhängig von der Form, Größe und Orientierungsgrad (4). Nimmt man als Medium NaCl (0,145 M), $\eta = 0,01 \text{ P}$ bei 25°C , vereinfacht sich die Gleichung:

$$\zeta = 12,85 \cdot v \quad \left[\frac{\text{Zetapotential in mV}}{1} \right] \quad (2)$$

1. Typen von Elektrophoresekammern

Zu den vorliegenden Versuchen wurde die mikroskopische Elektrophorese nach SEAMAN und MEHRISHI verwandt (27,28,29, 49,50). Dabei werden Zellen direkt durch das Mikroskop in ihrer Bewegung im Lösungsmittel beobachtet. Sie befinden sich dabei in einer zylindrischen Meßkammer, an welche eine Spannung angelegt wird. Im Okular des Mikroskopes befindet sich ein Meßgitter. Es wird die Zeit gemessen, die eine Zelle braucht, um eine bestimmte Strecke zurückzulegen.

Dieses Grundprinzip läßt sich in verschiedenster Weise verwirklichen. Die Beobachtung kann vertikal oder horizontal erfolgen, ebenso kann die Meßkammer stehend oder liegend angebracht werden. Von großem Einfluß auf die Meßdaten selbst ist die Art und Form der Meßkammer. Es wurden bisher mehrere Formen angegeben:

- Kammer nach ABRAMSON, mit flacher, breiter Meßkammer mit verschiedenen Modifikationen, z.B. nach RUHENSTROHT-BAUER (36)
- Kammer nach CHOUCROUN
- Doppelkammer von SMITH + LISSE (aus: BIER, Elektrophoresis)

- Kammer nach MEHRISHI

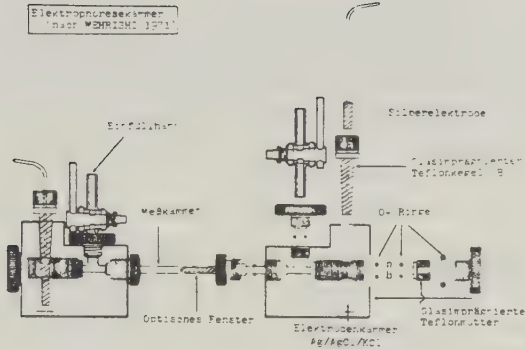


Abb. 2

2. Messung der Viskosität

Für die Messungen der Viskosität wurde ein WELLS-BROOKFIELD Mikroviskosimeter benutzt. Verwendet wird dabei eine von SCHMID-SCHÖNBEIN (43) angegebene Zusatzkammer, die aus einer Kombination der Platte-Kegel und der Couette-Anordnung besteht. Das Gerät gestattet Messungen bei Schergraden zwischen $0,23 \text{ sec}^{-1}$ bis 160 sec^{-1} . Der Antrieb erfolgt über einen Synchronmotor, welcher über einen veränderbaren Sinuswellengenerator betrieben wird. Gegen Oberflächenartefakte wurde ein Schutzring eingebaut.

3. Versuchsmaterialien

Alle Versuche wurden an menschlichem venösen Blut durchgeführt, welches mit EDTA (1,5 mg/ml) ungerinnbar gemacht wurde. Die Zellen wurden zunächst dreimal in isotonischer, gepufferter NaCl-Lösung ($\text{pH } 7,35 \pm 0,05$, Zusatz von 0,25 % Humanalbumin) gewaschen und daran anschließend mit den verschiedenen Enzymen behandelt.

Tabelle 1 Behandlung der Erythrozyten mit Enzymen

E.C.C.	Enzym	Konzentration
3.4.4.4	Trypsin	1mg/1ml packed cells
3.4.4.5	Chymotrypsin	1mg/ " "
3.2.1.16	Wuraminidase	500U/ " "
	Pronase	1mg/ " "
3.4.4.1	Papain	1mg/ " "
3.2.1.35	Hyaluronidase	1mg/ " "
4.4.7	Elastase	1mg/ " "

Dauer der Einwirkung: 45 min

Temperatur : 37°C

pH-Wert : 7,2

in der 5-fachen Menge NaCl(0,145 M) suspendiert

Nach der Enzymbehandlung wurden die Zellen erneut dreimal in der Lösung gewaschen und dann entweder in ihrem homologen Plasma oder aber in Dextran-Lösungen bzw. in Gemischen von Dextran-Lösungen und Plasma resuspendiert. Als Kontrolle dienten Zellen, die ebenfalls sechsmal gewaschen und dazwischen ohne Zugabe der Enzyme inkubiert worden waren. Alle rheologischen Experimente im Viskosimeter bzw. bei der photometrischen Aggregometrie wurden bei einem Hämatokritwert von 45 % und einer Temperatur von 37°C durchgeführt. Die elektrophoretische Wanderungsgeschwindigkeit wurde entweder in Kochsalz- (mit Bikarbonatpuffer) oder aber in homologem Plasma bzw. Dextran-Lösung (bei 25°C) durchgeführt. Wurde die elektrophoretische Beweglichkeit nicht in Kochsalzlösung gemessen, wurde der Wert mit der Viskosität des entsprechenden Mediums korrigiert. Folgende Dextran-Lösungen wurden verwendet:

Tabelle 2

Dextran	Charge Nr.	Mittleres Molekulargewicht $\bar{M}_w$	Mittleres numerisches Molekulargewicht $\bar{M}_n$
Dx 70	693	70 000	42 500
Dx 40	2514	41 800	25 700
Dx 20	7968	22 300	15 000
Dx 10	8373	10 300	5 400

Ein Teil der Versuche wurde mit dem Präparat Rheomacrodex^R, einer weniger gut fraktionierten Dextran-Lösung, durchgeführt.

Hersteller: Pharmazia Uppsala, Schweden, frdl. zur Verfügung gestellt durch Fa. KNOLL AG, Ludwigshafen.

Es wurden Lösungen von 10 % (g/Vol.) in isotonischem, gepuffer-tem NaCl hergestellt. Den in diesem Medium inkubierten Erythrozyten wurde - falls nicht anders angegeben - 1 % (g/Vol.) Albumin zugesetzt, um die Stechapfelbildung zu verhindern.

4. EDTA - und Citratblut

Es wurde vom gleichen Spender sowohl mit EDTA als auch mit Na-Citrat Blut entnommen. Nach dem üblichen dreimaligen Waschen wurde die elektrophoretische Beweglichkeit in Kochsalzlösung und Plasma gemessen. Dabei konnte kein signifikanter Unterschied bei den beiden Proben festgestellt werden. Für die weiteren Versuche wurde das Blut immer mit EDTA abgenommen. Ebenso wurde zum Waschen Kochsalz mit Na-Bicarbonat bzw. Na-Phosphatpuffer verwendet. Auch hier zeigten sich keine Unterschiede der elektrophoretischen Beweglichkeit.

Die Messung der Aggregationsparameter ($t_{1/2}$, γ Tmin und TSAR, s.u.) ergab an normalem unbehandeltem Blut innerhalb der ersten 6 Stunden nach Abnahme der Blutprobe keine signifikanten Abweichungen (Standardabweichung $< \pm 5$ % der Mittelwerte). Dagegen zeigten alle irgendwie vorbehandelten Erythrozyten bei Lagerung in Plasma, mehr noch in künstlichen Suspensionsmedien, nach 1 - 3 Stunden eine abnehmende Aggregationstendenz. Dies ist bedingt durch eine Stechapfelbildung; welche allerdings leicht mikroskopisch und auch daran erkannt werden kann, daß die Ausrichtung der Zellen in der Strömung gestört wird und damit insgesamt die Abhängigkeit der Lichttransmission von der Strömungsgeschwindigkeit viel weniger ausgeprägt ist (s.u.). Diese Abnormalität läßt sich nicht nur während des Versuches, sondern auch bei späterer Auswertung ohne weiteres erkennen und der entsprechende Versuch kann dann eliminiert werden. Um dies möglichst weitgehend zu verhindern, wurde dafür Sorge getragen, daß die rheologischen Messungen baldmöglichst, in der Regel 1 - 1 1/2 Stunden nach Zumischung zur entsprechenden Suspension, abgeschlossen waren.

Die Stechapfelbildung war besonders ausgeprägt, wenn die Zellen langfristig bei geringen Enzymkonzentrationen inkubiert wurden. Wir entschlossen uns daher, die in Tabelle 1 angegebenen höheren Enzymdosen in kurzer Zeit zu applizieren, da dadurch die

Stechapfelbildung auf ein Minimum reduziert werden konnte. Längere Inkubation führte in der Regel nicht zur signifikanten Abnahme in der elektrophoretischen Beweglichkeit.

II. DURCHFÜHRUNG DER VERSUCHE

1. Durchschnittswerte und Streuung

Die Werte der elektrophoretischen Beweglichkeit von menschlichen Erythrozyten in Kochsalzlösung sind in der Literatur nicht einheitlich und schwanken beträchtlich. BIER gibt einen Wert von $-1,31 \frac{\mu\text{m/sec}}{\text{V/cm}}$ an (4). In neuerer Zeit geben die meisten Autoren recht übereinstimmend den Wert von $-1,08 \frac{\mu\text{m/sec}}{\text{V/cm}}$ an, was vermutlich auf eine bessere Standardisierung der Versuchsbedingungen zurückzuführen ist (3,14,23,24,27, 37).

Dabei ist zu beachten, daß die elektrokinetischen Eigenschaften zwischen den einzelnen Spezies variieren, aber innerhalb der Spezies ziemlich konstant sind und unabhängig von: Rasse, Alter, Geschlecht und Blutgruppe (4).

Die Beweglichkeit der Erythrozyten ändert sich nicht durch Hämolyse, unabhängig davon, ob diese osmotisch, durch Gefrieren, Chloroform etc. hervorgerufen wird. Daraus wird geschlossen, daß diese Eigenschaften an die Struktur der Erythrozytenmembran gebunden ist (4). Das Suspensionsmedium selbst stellt einen wichtigen Faktor für die elektrophoretische Beweglichkeit dar. STOLTZ et al. (53) geben die Beweglichkeit in Kochsalz mit $-1,1 \pm 0,04 \frac{\mu\text{m/sec}}{\text{V/cm}}$ an. Für andere Medien erhielten sie folgende Werte:

Plasma	: $-1,27 \frac{\mu\text{m/sec}}{\text{V/cm}}$	
Serum	: $-1,37 \frac{\mu\text{m/sec}}{\text{V/cm}}$	
NaCl + Albumin	: $-1,32$	" (1 g % Albumin)

Die eigenen Messungen mit der Kammer nach MEHRISHI ergaben folgende Werte:

E.B. :	$-1,074 \frac{\mu\text{m/sec}}{\text{V/cm}}$	in NaCl, t = 25 °C, pH = 7,2
S.D. :	$\pm 0,05 \frac{\mu\text{m/sec}}{\text{V/cm}}$	
Zeta-Potential :	$-13,8 \text{ mV}$	(nach Gleichung (2))

Bei Messungen im Plasma wurde die Viskosität berücksichtigt; es ergaben sich dann Werte, die etwa denen von LARCAN u. STOLTZ sowie SEAMAN angegebenen entsprachen. Wir fanden, daß die für die Viskosität korrigierte Beweglichkeit von Erythrozyten in Plasma um ca. 25 % erhöht war, aber relativ große Streuungen aufwies. Wie weiter unten ausgeführt, zeigt sich bei Zugabe von Albumin eine Zunahme der E.B. bereits bei 1 g % Albuminzusatz. Die in NaCl erzielten Werte zeigen eine gute Übereinstimmung mit dem von MEHRISHI angegebenen Wert von $-1,08 \pm 0,02 \frac{\mu\text{m}}{\text{sec}}$.

Die bei den Versuchen beobachtete unterschiedliche Laufzeit $\frac{v}{cm}$ der Erythrozyten bis zu 20 % bedurfte einer Klärung der Ursachen, um eventuelle Meßfehler zu erkennen.

2. Klärung der Streuung: Registrierung mittels Fernsehbandaufzeichnung

Dazu wurde an das Mikroskop eine Fernsehkamera angeschlossen, die mit einem Monitor sowie mit einem Videorekorder (Ampex) verbunden war. Dadurch war es möglich, alle in einem Blickfeld befindlichen Erythrozyten nacheinander zu messen, indem ein durchgeführter Versuch beliebig oft auf dem Bildschirm wieder abgespielt wurde. Dadurch konnten zwei mögliche Fehlerquellen ausgeschaltet werden, die für eine Streuung der Ergebnisse hätten verantwortlich sein können:

- a) Änderung der Feldstärke während des Versuchsablaufs, der ca. 10 Minuten in Anspruch nimmt. Dies wurde dadurch ausgeschlossen, daß die Laufzeit nur ca. 10 Sekunden betrug. Anschließend wurden nun einzelne Erythrozyten durch wiederholtes Abspielen des Bandes in ihrer Laufzeit gemessen. Dies kommt einem faktisch gleichzeitigen Messen von vielen Erythrozyten gleich.
- b) Ausschalten von subjektiven Zeitmessfehlern durch mehrmaliges Messen der Laufzeit des gleichen Erythrozyten.

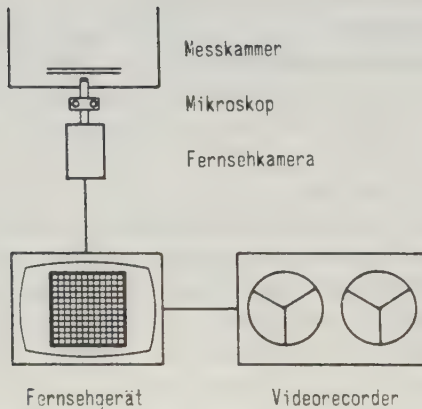


Abb. 3

Anordnung zur simultanen Messung der Laufzeit von Erythrozyten in der Elektrophoresekammer.

Die Bandauswertung ergab ganz klar, daß zwischen den einzelnen Erythrozyten doch erhebliche Laufzeitunterschiede sind, die sogar optisch erkannt werden konnten, wenn zwei unterschiedliche Erythrozyten zufällig nebeneinander herliefen.

Dabei wurden bei einem Mittelwert von $t = 4,82 \text{ sec}$, Laufzeiten von $3,9 \text{ sec}$ bis $5,8 \text{ sec}$ gemessen. Umgerechnet auf die elektrophoretische Beweglichkeit ergibt sich dann:

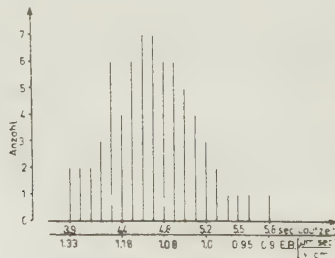


Abb. 4

Messung von einzelnen Erythrozyten: Maxima - Minima

Die in den Versuchen erhaltenen Werte liegen alle innerhalb dieser Grenzen. Dabei wurden jeweils 10 - 20 Einzelmessungen zu einem Mittelwert zusammengezogen.

Tabelle 3

Beispiel einer Messreihe

Laufzeit der Erythrozyten durch das Messgitter in sec

4,5	3,9	4,7	4,7	4,3	5,8	5,4	5,3	sec
4,8	4,8	5,0	5,1	4,8	4,9	4,8	4,4	sec

M	n	SD	SE	VARIANZ	tmin	tmax
4,82	16	0,45	0,11	3,07	3,9	5,8

Es kann also davon ausgegangen werden, daß die Ladungen der einzelnen Erythrozyten in der Größenordnung von $\pm 20\%$ schwanken. Die Differenzen in den Messwerten beruhen also nicht auf Messfehlern, sondern sind durch den Erythrozyten als ein biologisches System bedingt.

3. Mögliche Gründe der Streuung

Weiterhin ist der Zusammenhang zwischen dem Aufbau der Erythrozytenmembran und dem Ladungsverteilungsmuster umstritten. Die meisten Autoren gehen davon aus, daß die negative Ladung zum größten Teil von den α -carboxyl-Gruppen der N-acetyl-Neuraminsäure gebildet wird. Die restliche negative Ladung soll aus nicht identifizierten Gruppen bestehen; positive Ladungen konnten bisher nicht sicher nachgewiesen werden (4,13,14,28,51).

Es wäre also denkbar, daß die Struktur der Zellmembran bei jedem Erythrozyten individuell verschieden ist (primärer Unterschied) oder aber im Laufe des Erythrozytenlebens von 120 Tagen durch mechanische und chemische Einwirkungen verändert wird (sekundärer Unterschied).

Der Einfluß der Größe des einzelnen Erythrozyten wäre ein weiterer denkbarer Grund für die unterschiedliche Laufzeit. Die Größe der Erythrozyten schwankt erheblich nach CHEN u. FUNG; die größten erreichen Durchmesser bis 17,06 μm (8).

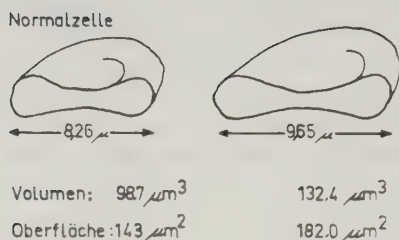


Abb. 5

Größenverhältnisse von Erythrozyten.

Dabei ist aber zu berücksichtigen, daß die elektrophoretische Beweglichkeit offenbar nicht von der Form der Zelle beeinflusst wird, denn auch Rouleaux, Stechäpfel, ghost-cells, ja sogar aldehydfixierte Zellen zeigen die gleiche Laufzeit (50). Die biologische Streuung verlangt naheliegenderweise eine sehr hohe Zahl von Messungen immer dann, wenn sehr diskrete Unterschiede erfaßt werden sollen. In den hier vorliegenden Experimenten wurden indes in der Regel sehr deutliche Unterschiede zwischen Kontrollen und behandelten Zellen beobachtet. Die geringen Effekte von Elastase und Hyaluronidase wurden nicht nur hinsichtlich der Ladung, sondern auch hinsichtlich des rheologischen Verhaltens untersucht; aus dieser Kombination von Befunden wird auf die geringe Wirksamkeit dieser Enzyme geschlossen.

Ein weiterer Grund für die große Streuung könnte durch die Geometrie der MEHRISHI - Kammer gegeben sein. RUHENSTROTH-BAUER und SCHINDLER geben in der rechteckigen Kammer nach RUHENSTROTH-BAUER nur eine äußerst geringe Streuung an (61). In dieser Kammer ist die stationäre Ebene plan und nicht gekrümmt wie in der zylindrischen Kammer; dadurch sedimentieren die Erythrozyten nicht aus der stationären Ebene heraus. Dieser Effekt kann allerdings nicht allein die mit meiner Versuchstechnik erhaltene größere Streuung erklären, da durch die verwendete Optik nur ein Gesichtsfeld von 120 μ und eine sehr geringe Tiefenschärfe erzielt wurde.

III. MESSUNG DES AGGREGATIONSVERHALTENS VON ERYTHROZYTEN

Das Aggregationsverhalten wurde einerseits subjektiv bzw. durch photographische Aufnahmen in der Kammer eines Rheoskops (22) beobachtet. Andererseits ist eine objektive Aggregometrie in einer von KLOSE et al. angegebenen Kammer möglich, in welcher die Lichttransmission einer Blutprobe als Funktion variabler Schergrade mit Hilfe einer Photozelle gemessen wird. Die Kammer besteht aus Kegel und Platte, welche beide aus Plexiglas gefertigt sind. Im Spalt zwischen Platte und Kegel befindet sich die Blutprobe, welche durch Rotation des Kegels in eine viskosimetrische Strömung versetzt wird. Durch einfache Variation der Umdrehungsgeschwindigkeit des Kegels können beliebige Schergrade und Wechsel zwischen Strömung und Strömungsstillstand vorgegeben werden.

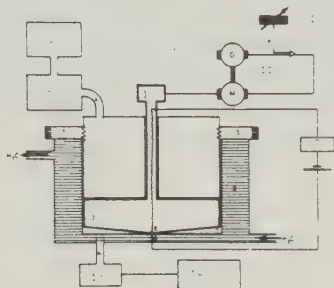


Abb. 6

Aufbau des verwendeten Rheoskops (22)

1=Meßkammer, 2=Kegel, 3=thermostatisierter Zylinder mit durchsichtiger Platte, 4=Glasfaserbündel, 5=Einstellring, 6=elektrische Kontaktpunkte an Kegelspitze und Platte, 7=Kontaktanzeiger, 8=Lichtquelle, 9=Konstantspannungsquelle, 10=Getriebe, 11=Generator G und Motor M mechanisch gekoppelt, 12=variabler Spannungsteiler, 13=Photozelle, 14=Verstärker und Kompensationsschreiber

1. Scherungsresistenz der Aggregate

Die Lichttransmission einer Blutprobe nimmt immer dann zu, wenn die Erythrozyten entweder orientiert sind (was nach Dispersion von Aggregaten nach hohen Schergraden auftritt) oder aber, wenn die Zellen aggregiert sind (was bei niedrigen Schergraden bzw. in Stase vorkommt (46)). Reduziert man in einem Ex-

periment kontinuierlich die Schergrade, so nimmt also zunächst die Lichttransmission ab (bedingt durch Abnahme der Orientierung), um dann unterhalb eines für jedes Blut charakteristischen Schergrades wieder zuzunehmen (bedingt durch die Zunahme der Erythrozytenaggregation).

Diese Abhängigkeit der Lichttransmission von Aggregatzuständen erlaubt eine rheologische Analyse. Der Schergrad der minimalen Lichttransmission ($\dot{\gamma}^{Tmin}$) ist umso höher, je höher die adhäsiven Kräfte zwischen den Erythrozyten sind. Er entspricht demjenigen Schergrad, welcher notwendig ist, um Zellaggregate dispergiert zu halten (46). Mißt man zusätzlich den für diesen Schergrad zugehörigen Schubspannungswert (was durch zusätzliche Messung im Rotationsviskosimeter leicht möglich ist), so läßt sich die Schubspannung berechnen, welche zur hydrodynamischen Desaggregation von Erythrozytenaggregaten notwendig ist (46).

2. Bestimmung der Halbwertszeit

Die Geschwindigkeit, mit welcher sich Erythrozytenaggregate nach hydrodynamischer Desaggregation ausbilden, läßt sich ebenfalls photometrisch bestimmen. Alle Blutproben konnten durch ausreichend hohe Schergrade dispergiert werden. Die Aggregate bildeten sich jedoch in allen Fällen sofort wieder, sowie die Strömung in der Kammer abgestoppt wurde. Da die Aggregation die Lichttransmission erhöht, kann dieser Prozess photometrisch registriert werden. In letzter Zeit wurde festgestellt (44), daß die erste Ableitung der Zunahme des Photostroms $\frac{dV}{dt} = \dot{J}$ exponentiell mit der Zeit abfällt nach der Gleichung $\dot{J}(t) = J_0 \cdot e^{-\lambda t}$. Durch die Ermittlung der Halbwertszeit dieses exponentiellen Abfalls läßt sich die Aggregationskonstante λ errechnen: $\lambda = \frac{\ln 2}{t_{1/2}}$ (44)

3. Strömungsverhalten von Erythrozytenaggregaten bei langsamer Strömung

Normale menschliche Erythrozyten in normalem menschlichem Plasma bilden Primäraggregate in Form gestreckter Geldrollen und Sekundäraggregate durch Vernetzung dieser Geldrollen durch End-zu-Seit-Apposition. Pathologische Aggregation menschlicher

Erythrozyten, wie sie spontan bei vielen Erkrankungen vorkommt, ferner bei bestimmten Formen artefizieller Aggregation mit hochmolekularen Proteinen (SCHMID-SCHÖNBEIN u. GALLASCH) (41) hochmolekularem Dextran (VOLGER) (57) sowie nach Reduktion der Zellladung (siehe unten) auftritt, ist durch eine Verklumpung der Primäraggregate mit Seit-zu-Seit-Apposition (SCHMID-SCHÖNBEIN, 40,41,56) und der elastischen Kontraktion der Rouleaux verbunden. Dadurch entstehen große Lücken zellfreien Plasmas zwischen den Aggregaten, während innerhalb der Aggregate viel weniger Plasma mobilisiert wird als bei physiologischer Aggregation.

Diese beiden Typen der Zellaggregation verhalten sich bei langsamer Strömung qualitativ und quantitativ eindeutig verschieden; ein Unterschied, welcher photometrisch erfaßbar ist. Normal aggregiertes Blut wird während langsamer Scherung partiell dispergiert gehalten, seine Lichttransmission ist also in langsamer Strömung (T_7) geringer als in Stase (T_0).

Ganz anders verhalten sich pathologische Erythrozytenaggregate bei langsamer Strömung. Hier ist ein fortlaufendes Wachstum der einzelnen Aggregate trotz konstanter langsamer Strömung zu beobachten. All dies hat zur Folge, daß das Blut fortlaufend immer mehr entmischt wird, wodurch auch die Lichttransmission des Blutes trotz konstanter Scherung zunimmt, so daß nach einer Zeit von 1 Minute die Aggregation ausgeprägter und die Lichttransmission (T_7) höher ist als die Lichttransmission derselben Probe in Stase (T_0) (41,42,44,56,57)

Die beschriebenen Effekte sind die Grundlage einer sehr einfachen Möglichkeit, die Grundtendenz pathologischer Aggregate in der Strömung zu quantifizieren. Bildet man den Quotienten aus der Photospannung bei 7 sec^{-1} und bei Stase (jeweils gemessen 60 sec nach Umschaltung von schneller Mischbewegung), so ist dieser Quotient (als Flow to Stasis Aggregation Ratio: $\text{FSAR} = T_7/T_0$) ein Maß dafür, ob, wie bei normalem Blut, durch die Strömung Aggregate dispergiert werden ($\text{FSAR} < 1$) oder aber "pathologische Aggregation" durch die Strömung induziert wird ($\text{FSAR} > 1$). Die Geschwindigkeit der Bildung, die Scherungsresistenz der Aggregate und der FSAR-Quotient hängen von durchaus verschiedenen Faktoren ab und die gleichzeitige Bestimmung aller dieser Parameter ist von

beträchtlichem Informationswert (46).

4. Quantifizierung des Ausmaßes der Aggregation bzw. der Zellorientierung

Schließlich kann das rheologische Verhalten der Aggregation graphisch dadurch festgehalten werden, daß für jeden Schergrad die Lichttransmission aufgetragen wird. Zur besseren Vergleichbarkeit der Unterschiede zwischen verschiedenen Blutproben werden die Photospannungen jeweils als Relativwerte angegeben, die dadurch gewonnen werden, daß alle Photospannungen durch den Minimalwert bei völliger Dispersion (T_{min}) geteilt werden.

Für einige Messungen wurde eine verkleinerte Ausführung der Meßkammer nach GALLASCH (41) verwandt, das im Prinzip den gleichen Aufbau zeigt, aber mit einer Blutmenge von nur 20 μ l auskommt.

Schließlich wurden auch in dem sogenannten gegenrotatorischen Rheoskop (42) FSAR und Halbwertszeit bestimmt, nachdem gezeigt worden war, daß diese Werte (nicht dagegen der γT_{min}) in der makroskopischen und mikroskopischen Kammer identische Meßwerte ergaben.

Nachdem sich zeigte, daß in der Regel diejenigen Enzyme, welche eine meßbare Erniedrigung der elektrophoretischen Beweglichkeit bewirkten, auch die Aggregation der Zellen in Plasma steigerte, ergab sich logischerweise die Frage, ob durch die Enzymbehandlung auch die mechanischen Eigenschaften der Einzelzellen beeinflusst wurden. In diesem Zusammenhang ist besonders die Frage von Bedeutung, ob die physiologische Verformbarkeit der Erythrozyten beeinträchtigt wird. Da in plasmatischem Milieu eine Zellaggregation die Messung der Zellverformbarkeit oder aber zumindest deren Deutung erschwert, zogen wir es vor, die Verformbarkeit der Erythrozyten vor und nach Enzymbehandlung in einer 1%igen Albuminlösung zu messen. Die Verformbarkeit einzelner Zellen kann neuerdings (SCHLICK) dadurch bestimmt werden, daß die Passagedauer der Erythrozyten durch eine Pore von 5 μ m $\emptyset$ und 11 μ m Länge bei treibenden Drucken zwischen 2 cm und 5 cm H_2O elektronisch gemessen wird (38).

IV. ERGEBNISSE

1. Elektrophoretische Beweglichkeit

Für die mit den oben genannten Enzymen behandelten Erythrozyten ergaben sich folgende Werte für die elektrophoretische Beweglichkeit in salinem Milieu:

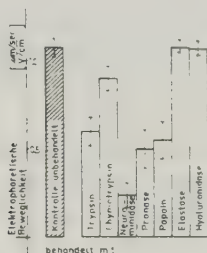


Abb. 7

Elektrophoretische Beweglichkeit enzymbehandelter Erythrozyten in NaCl (0,145 M, pH 7,2, 25 °C).

Hyaluronidase und Elastase ergaben demnach unter den oben angegebenen Versuchsbedingungen keine Ladungsänderung, Chymotrypsin zeigt eine geringe Abnahme. Trypsin, Pronase und Papain erniedrigen die Ladung auf ungefähr die Hälfte und Neuraminidase auf ein Viertel des Kontrollwertes. Neuraminidase hat demnach schon im Mittelwert den deutlichsten Effekt auf die elektrophoretische Beweglichkeit. Bei einigen Versuchen war die Wirkung so stark, daß überhaupt keine Bewegung mehr im angelegten elektrischen Feld vorhanden war. In solchen Fällen haben wir durch Beimischung normaler Zellen festgestellt, daß das Gerät funktionierte. Die Ursache für die fast völlige Aufhebung der Beweglichkeit ist unklar, da nach MERISHI (28) Neuraminidase eigentlich nicht alle negativen Ladungen von der Erythrozytenmembran ablösen sollte.

Durch die Einwirkung proteolytischer Enzyme kommt es vermutlich zur Abspaltung an den Glykolipiden und Glykoproteiden der Zellmembran. Art und Ort der Aktivitäten hängen von den einzelnen Enzymen und deren Spezifität ab. LARCAN u. STOLTZ (25) haben folgendes Modell vorgestellt:

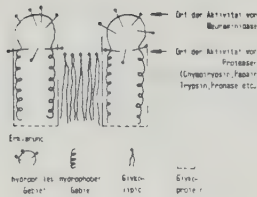


Abb. 8

Modellvorstellung vom Ort der Enzymaktivitäten an Membranstrukturen

Bisher wurden schon zahlreiche Untersuchungen über die Art der Ladungsänderung durch Enzyme angestellt (4,13,14,16,28,32, 51,52,55). Dabei wurde festgestellt, daß Ladungsänderung nicht durch Verbindung des Enzyms mit der Membran entsteht, da inaktiviertes Enzym, das ja auch der Membran aufsitzen würde, keine Änderung der Ladung hervorruft (14,50). Allerdings ist dabei zu berücksichtigen, daß ein solcherart vorbehandeltes Enzym in seiner Raumstruktur doch verändert sein dürfte und damit nicht mehr mit dem Rezeptor an der Membran übereinstimmt. Weiter dürfte auch bei sorgfältigem Waschen nicht alles Enzym von der Oberfläche der Membran abgehen (61).

Durch die Enzymbehandlung wird die E.B. verändert sowie Änderungen in den biologischen, physikochemischen und immunologischen Eigenschaften der Zellen hervorgerufen. Die heutigen Vorstellungen über die verschiedenen Enzymwirkungen sind im Folgenden kurz skizziert (1,2).

TRYPSIN setzt dabei ein Sialomucopeptid frei (13), als Endopeptidase spaltet es die Bindungen: Lysin---X und Arginin---X. SEAMAN beobachtete bei Trypsin-Behandlung ein Anwachsen im Volumen und ein Absinken der elektrophoretischen Beweglichkeit um ca. 20 % (50).

CHYMOTRYPSIN weist eine ähnliche Aminosäuresequenz wie Trypsin auf, die Spezifität ist aber eine andere: Phenylalanin---X, Tyrosin---X.

NEURAMINIDASE setzt N-Acetylneuraminsäure frei, die Bestandteil von Zellmembranen (Glykolipide, Glykoproteide) ist und eine Rolle beim Anheften und Eindringen von Viren spielt (Rezeptor). Neuer-

dings ist eine Neuraminidaseaktivität auch bei einer Reihe anderer Mikroorganismen erkannt worden: Vergrünende Streptokokken, Pneumokokken, Corynebakterien, Pasteurella multocida, Trichomonas foetus und Mykoplasmen (MÜLLER, 59)

PAPAIN ist eine pflanzliche Protease, die Elastin auflöst.

PRONASE stellt ein Enzymgemisch mit verschiedenen lipolytischen und esterolytischen Aktivitäten dar, welches sowohl positive als auch negative eiweißhaltige Ladungsträger aus der Flächenstruktur der Erythrozytenmembran herauslöst, die aber in unregelmäßiger mechanischer Verbindung zur eigentlichen Membran bleiben (16).

DANON konnte mit positiv und negativ ionisiertem Ferritin nachweisen, daß in diesen Brückenstrukturen negative und positive Ladungsträger vorhanden sind. Nach MORIHARA u. TZUZUKI spaltet es dabei folgende Stellen: Bz-Arginin-NH₂; Bz-Arg-OEt; Ac-Lysin-OMe (Erklärung: OEt=Äthylester; OMe=Methylester, Bz=Benzoyl- (31).

HYALURONIDASE hydrolysiert Mucopolysaccharide und hochmolekulare Lösungen. Acetylsalicylsäure wirkt hemmend. Hyaluronidase setzt Thrombokinasen frei und beschleunigt dadurch die Blutgerinnung.

ELASTASE ist eine Proteinase, die durch NaCl stark gehemmt wird. Im Serum soll ebenfalls ein nicht dialysierbarer Inhibitor vorhanden sein. Trypsin führt die inaktive Proelastase in aktive Form über.

2. Auswirkungen auf die Aggregation in Plasma

Nachdem festgestellt wurde, daß die Reduzierung der Erythrozytenladung die Aggregation - wenn auch in unterschiedlichem Ausmaß - in homologem Plasma verstärkt hatte, wurden entsprechende Versuche mit Suspensionen von normalen und behandelten Zellen in isotonen Lösungen von Humanalbumin (1% bis 10%) durchgeführt. Weder mit den unbehandelten noch mit den behandelten Zellen, auch nicht nach Pronasebehandlung, kam es jeweils zu einer auch noch so geringen Aggregation. Die Behauptung, daß überhaupt keine Aggregation stattfindet, stützt sich nicht allein auf die Beobachtung der Suspensionen im Mikroskop bzw. Rheoskop, sondern darüber hinaus auf die objektive Registrierung der Lichttransmission dieser Suspensionen bei variablen Schergraden. In allen Fällen zeigten sich nämlich die höchsten Lichttransmissionen in Stase und stiegen mit steigenden Scher-

graden kontinuierlich an. Dies ist durch die Ausrichtung der Zellen in der Strömung bedingt (22,46), (siehe auch Abb. 18, wo dieses Verhalten für nichtaggregierende Kontrollerythrozyten in Rheomacrodexlösung gezeigt ist).

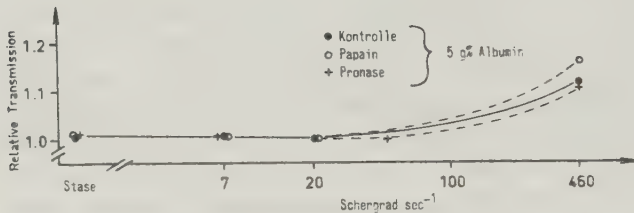


Abb. 9

Verhinderung der Aggregation durch Albumin auch bei enzymbehandelten Zellen mit erniedrigtem Zetapotential.

In einigen Versuchen wurde festgestellt, daß unter bestimmten Bedingungen bereits 0,5 g% Albumin sich hemmend auf das Aggregationsverhalten auswirkt. Aus diesen Gründen wurde in den Versuchen mit Dx 10 und Dx 20 und trypsinbehandelten Zellen ohne Albumin gearbeitet. Um trotzdem keine Stechapfelform der Erythrozyten zu erhalten, wurden diese erst unmittelbar vor den Versuchen in die Dextranlösungen gegeben.

Zugabe von Albumin führt zu einer Erhöhung der E.B. (23). Die erhaltenen Werte zeigen die gleiche Tendenz wie diejenigen von Dextranlösungen sowie desjenigen Effektes, welcher durch Plasma ausgelöst wird. Wie seit SACHTLEBEN u. RUHENSTROTH-BAUER bekannt, hat die Suspension von Erythrozyten in pathologischem Plasma den scheinbar paradoxen Effekt, sowohl die E.B. als auch die Zellaggregation (sogenannte Agglomeration) zu steigern. In Albumin wurde die viskositätskorrigierte Beweglichkeit bei 1 g % um 13 %, bei 2 g % um 22 % und bei 5 g % sogar um 41 % erhöht. Orientierende Versuche zeigten auch einen ähnlichen Effekt bei neuraminidasebehandelten Zellen. Diese Befunde stimmen mit denjenigen der Literatur überein und müssen nach BROOKS u. SEAMAN (6,7) dahingehend interpretiert werden, daß durch die Adsorption von Makromolekülen an die geladene Membran die Verteilung der Gegen-

ionen gestört wird. Zur Erklärung ihrer Befunde in Dextran hatten diese Autoren angenommen, daß die dichte Anlagerung der Makromoleküle durch eine Art sterischer Behinderung die Gegenionen davon abhalten, sich den geladenen Molekülteilen anzunähern. Dadurch wiederum fällt die Kraft der elektrostatischen Abstoßung weniger schnell ab und ist in der hypothetischen "plane of shear", deren genaue Lage jetzt noch weniger gut definiert ist, noch höher. Die Folge: trotz gleicher Ladungsdichte auf der Erythrozytenmembran wird eine höhere E.B. gemessen.

Nach Einwirkung der Enzyme kommt es in allen Fällen zu einer Erythrozytenaggregation im Plasma. Art und Ausmaß der Aggregation sind gegenüber den Kontrollen jedoch in ganz charakteristischer Weise verändert. Die Enzyme Hyaluronidase und Elastase, welche die E.B. nicht beeinflußt hatten, änderten auch den Typ der Aggregation nicht meßbar. Dagegen führten Trypsin, Papain, Chymotrypsin, Pronase und Neuraminidase zu einer deutlichen Wirkung auf die Aggregation. Als besonders auffallendes Ergebnis konnte festgestellt werden, daßunter der Einwirkung der oben angegebenen Enzyme jedoch keine einfache Beziehung zwischen der Verringerung der E.B. und der Zunahme der Aggregation besteht. Außerdem beeinträchtigen die verwendeten Enzyme in unterschiedlicher Weise das rheologische Verhalten der Erythrozytenaggregate. Die auffallendste Steigerung der Aggregation wurde in allen Versuchen durch das Enzym Pronase verursacht. Hier kam es zum deutlichsten Anstieg der Aggregationskonstanten λ , der Scherungsresistenz und vor allem zu einer sehr massiven Klumpenbildung, d.h. Aggregatswachstum bei langsamer Strömung, so daß die mit Pronase behandelten Zellsuspensionen ohne Ausnahme einen FSAR-Wert von über 1,0 aufwiesen. Das andere Extrem bildet das Enzym Neuraminidase. Unter seinem Einfluß wurde die stärkste Reduktion der elektrophoretischen Beweglichkeit erzielt, welche so ausgeprägt war, daß gelegentlich einzelne Zellen überhaupt nicht mehr im elektrischen Feld wanderten. Gemessen an dieser kräftigen Reduktion ist die Veränderung in der Aggregationsneigung auffallend gering. Die Aggregationskonstante λ sank sogar im Mittel, der $\sqrt{\tau_{min}}$ blieb im Mittel unverändert und nur die Neigung zur Klumpenbildung (gemessen am FSAR) nahm ganz geringfügig zu.

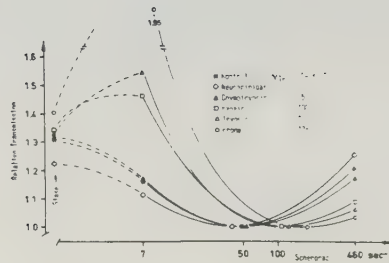


Abb. 10

Art und Ausmaß der Aggregation enzymbehandelter Erythrozyten in Plasma. Der Schergeschwindigkeit der hydrodynamischen Desaggregation ($\dot{\gamma}_{Tmin}$) ist ein Maß für die mechanische Stabilität der Aggregation.

Es soll allerdings nicht verschwiegen werden, daß in einem Fall - es handelte sich um einen Patienten mit schwerer Arteriosklerose - die Aggregationsneigung kräftig gesteigert wurde. In früheren Versuchen mit MEHRISHI wurde bei einer ca. 16-fachen höheren Dosis an Neuraminidase und bei Messungen mit Blutmengen von 20 μ l und Hämatokritwerten von 33 % in der gegenrotatorischen Kammer eine eindeutige Aggregationssteigerung beobachtet und auch mikrokinematographisch festgehalten. Aus Kostengründen verboten sich in der hier beschriebenen Versuchsreihe Versuche mit so hohen Neuraminidasedosen. Die Diskrepanz zwischen diesen und den oben geschilderten Versuchen bedarf einer weiteren Klärung. Sie kann jedoch nicht die Tatsache aus der Welt schaffen, daß Neuraminidase trotz starker Wirkung auf die elektro-phoretische Beweglichkeit in den Versuchen eine nur unbedeutende Aggregationssteigerung hervorrief, während umgekehrt Pronase bei vergleichsweise geringer Reduktion der elektro-phoretischen Beweglichkeit eine sehr ausgeprägte Aggregationssteigerung verursacht.

Eine Mittelstellung nehmen Trypsin, Chymotrypsin und Papain ein. Papain senkt die E.B. auf 51 %, führt aber nur zu einer mäßigen Aggregationssteigerung.

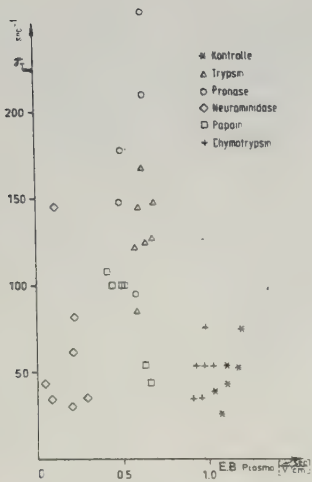


Abb. 11

Beziehung zwischen Ladung (gegeben durch die E.B.) und dem Schergrad maximaler Dispersion.

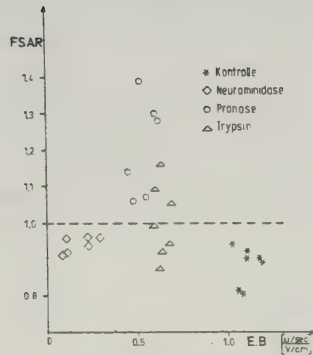


Abb. 12

Neigungsbereitschaft der Erythrozyten zur Klumpenbildung in Beziehung zu ihrer E.B.

Trypsin führt zu einer deutlichen Zunahme der Bildungsgeschwindigkeit der Aggregate (λ), auch nimmt die Scherungsresistenz zu, ebenso die Neigung zur Klumpenbildung in langsamer Strömung. In etwa der Hälfte der Fälle trat unter Trypsinbehandlung ein FSAR $>1,0$ ein, in allen Fällen jedoch steigerte sich der FSAR-Wert, wenn er in Prozent der jeweiligen Kontrolle gemessen wurde. Ebenso stieg er bei denjenigen Blutproben, bei denen er schon in der Kontrolle verhältnismäßig hoch lag, nach Enzymbehandlung auf einen Wert von über 1,0 an.

Einen Vergleich von verschieden stark aggregierendem Blut zeigt Abb. 13

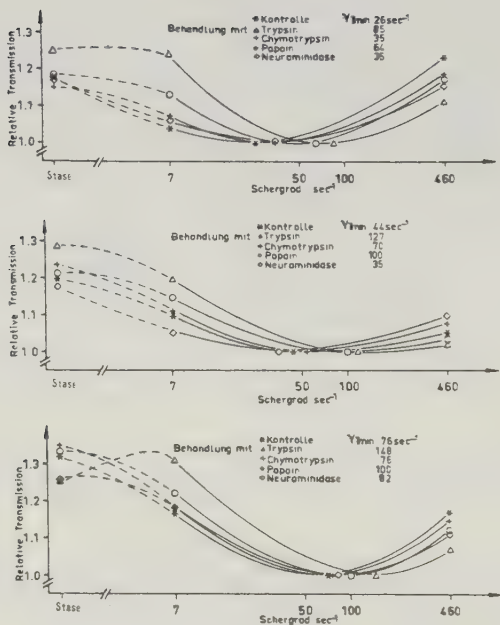


Abb. 13

Verhalten enzymbehandelter Erythrozyten in Plasmen mit schwacher, mittlerer und starker Grundtendenz zur Aggregation.

Bei mittelstark aggregierendem Blut liegt γT_{min} der Kontrolle bei 44 sec⁻¹; nach Trypsinbehandlung bei 127 sec⁻¹. Ein schwach aggregierendes Blut mit einem γT_{min} von 26 sec⁻¹ in der Kontrolle kommt dagegen nur auf einen Wert von 85 sec⁻¹ nach Trypsinbehandlung, während stark aggregierendes Blut mit einem Kontrollwert von 76 sec⁻¹ nach Trypsinbehandlung 148 sec⁻¹ erreicht. Bei den anderen Enzymen lassen sich ähnliche Vergleiche anstellen. Die Stärke der zusätzlichen Aggregation scheint also wesentlich von der vorgegebenen Aggregation abzuhängen.

Das Aggregationsverhalten enzymbehandelter Erythrozyten wird durch die Änderung der Ladung beeinflusst, es zeigt sich aber keine direkte Abhängigkeit von der Ladung. Der Grund hierfür liegt in der Komplexität des Aggregationsmechanismus. Hierbei dürften insbesondere der Adsorptionsmechanismus der adhäsiven Makromoleküle, möglicherweise auch Blutgruppenunterschiede, vor allem aber die

von Blutprobe zu Blutprobe stark wechselnde Konzentration adhäsiver Makromoleküle im Plasma eine Rolle spielen. Es ist durchaus denkbar, daß durch die Reduktion der Zellladung Makromoleküle eine adhäsive Wirkung gewinnen, die bei normalen Erythrozyten noch nicht aggregieren (siehe auch Seite 29).

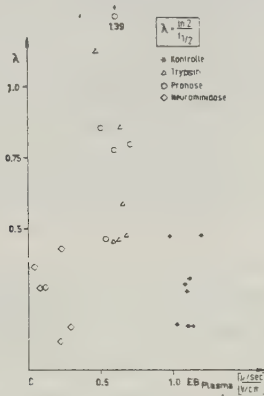


Abb. 14
Bildungsgeschwindigkeit von Aggregaten (λ) nach Enzymbehandlung.

3. Auswirkung auf die Viskosität von Erythrozytensuspensionen

Die Reduktion der Zellladung führt auch zu einer Zunahme der scheinbaren Viskosität, vorwiegend bei niedrigen Schergraden. Dies dürfte bedingt sein durch die Steigerung der Aggregation und läßt sich selbstverständlich nur quantifizieren, wenn die sonstigen Bedingungen, wie Temperatur, Hämatokrit und Plasma-viskosität konstant gehalten werden. Der ausgeprägteste Effekt findet sich nach Einwirkung von Pronase, wobei hier sowohl bei hohen Schergraden (160 sec^{-1}) als auch bei mittleren Schergraden (8 sec^{-1}) eine hochsignifikante Viskositätssteigerung festzustellen ist. Abb. 15 zeigt den typischen Verlauf der Blutviskosität. Diese nimmt mit zunehmender Scherkraft ab. Gegenüber der Kontrolle ergibt Neuraminidase mit der stärksten Ladungserniedrigung eine Zunahme der Viskosität um ca. 15 % bei niedrigen Schergraden, während sie sich bei höheren Schergraden wieder der Kontrolle nähert.

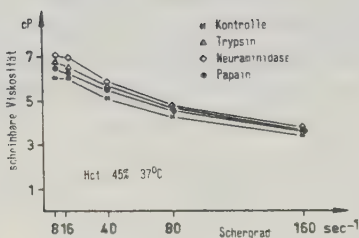


Abb. 15

Viskositätsänderung nach Enzymbehandlung bei verschiedenen Schergraden.

Trypsin und Papain mit ungefähr gleicher Ladungserniedrigung zeigen eine geringe Zunahme der Viskosität; die Zunahme der Viskosität pronasebehandelter Zellen in Plasma beträgt bei hohen Schergraden (160 sec^{-1}) 27 %, bei mittleren Schergraden (8 sec^{-1}) 43 %, bei wirklich niedrigen Schergraden ($< 1,0 \text{ sec}^{-1}$) würde sich noch wesentlich höher liegen. Die Beobachtung, daß eine Aggregationssteigerung auch bei hohen Schergraden zu einer so kräftigen Viskositätssteigerung führt, kann nur dadurch erklärt werden, daß ein Schergrad von 160 sec^{-1} nicht ausreicht, um die mit Pronase behandelten Zellen zu dispergieren. Mit anderen Worten: anstelle der physiologischen Zellausrichtung (Zellfluidität) findet sich trotz schneller Strömung eine mehr oder minder aggregierte Suspension, und man muß davon ausgehen, daß die vorhandenen - wenn auch nicht sehr großen - Aggregate sich funktionell wie Festkörper verhalten (39,40,48). Diese Tatsache wird nicht nur durch die Viskositätsmessungen belegt, sondern auch durch die photometrische Aggregometrie. Der ζ -Tmin-Wert, d.h. der Schergrad, der notwendig ist, um Aggregate dispergiert zu halten, liegt in der Tat bei pronasebehandelten Zellen in Plasma im Mittel bei 200 sec^{-1} , also deutlich oberhalb des Schergrades, bei dem die Viskosität gemessen wurde. Diese Deutung der Befunde wird auch durch die Experimente mit enzymbehandelten Zellen in Dextranlösungen gestützt. Hier fand sich ebenfalls nur dann eine Viskositätssteigerung enzymbehandelter Zellen, wenn mit anderen Methoden eine deutliche Aggregationszunahme meßbar war.

Eine alternative Deutungsmöglichkeit für den Befund erhöhter scheinbarer Viskosität bei 160 sec^{-1} könnte eine Versteifung der Einzelzellen, d.h. ein Fluiditätsverlust sein. Diese Möglichkeit ist hochgradig unwahrscheinlich, da in der Abwesenheit hochmolekularer Makromoleküle die Zellflexibilität unbeeinflusst war (siehe Seite 36).

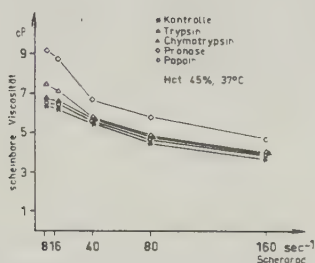


Abb. 16

Viskositätsänderung nach Enzymbehandlung bei verschiedenen Schergraden.

Auch nach Behandlung mit Trypsin, Chymotrypsin und Papain kommt es zu einer, wenn auch geringeren Viskositätszunahme und zwar hauptsächlich im Bereich niedriger Schergrade. Dies ist auf eine gesteigerte Aggregation zurückzuführen, jedoch bleibt festzuhalten, daß die Viskositätszunahme zwar eindeutig meßbar, prozentual jedoch wesentlich geringer ist als die Zunahme der photometrischen Parameter wie Scherungsresistenz der Aggregate, Halbwertszeit der Aggregatbildung bzw. die Änderung im rheologischen Verhalten bei langsamer Strömung (FSAR).

4. Suspensionen von enzymbehandelten Zellen in Dextranlösungen bzw. in Dextran-Plasmagemischen

JAN und CHIEN zeigten, daß nach Behandlung mit Neuraminidase menschliche Erythrozyten, welche in Dextranlösungen mit mittleren und niedrigen Molekulargewichten resuspendiert wurden, in allen Konzentrationen unter 3 g % eine Aggregation aufwiesen, während bei unbehandelten Zellen unterhalb eines mittleren Molekulargewichtes von 40 000 niemals eine Aggregation gefunden wird.

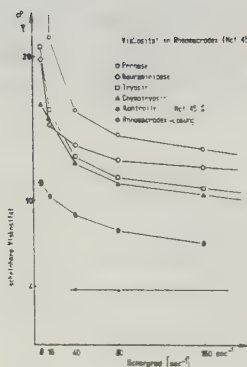


Abb. 17

Änderung der Viskosität einer 10%igen Rheomacrodex[®]-Lösung durch enzymbehandelte Erythrozyten.

Bei unseren Versuchen fanden wir bei Kontrollzellen in den uns vorliegenden Dextranschargen auch schon bei einem mittleren Molekulargewicht von 40 000 weder subjektiv noch bei objektiven Messungen irgendeinen Hinweis einer Zellaggregation. Auch wir fanden jedoch eine ausgeprägte Zellaggregation nach Behandlung mit Trypsin, Chymotrypsin, Neuraminidase und Pronase. Ein typischer Versuch mit Rheomacrodex[®] ist in Tabelle 4 und Abb. 17 und 18 wiedergegeben. Die Tatsache der Aggregation ist belegt durch den hohen Wert der scheinbaren Viskosität bei 8 sec^{-1} und 160 sec^{-1} . Die Tabelle zeigt außerdem, daß die Scherungsresistenz der Aggregate beträchtlich angestiegen war. Morphologisch ließen sich die Aggregate von den typischen Aggregaten in Geldrollenform nicht unterscheiden.

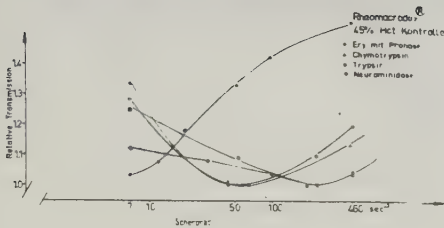


Abb. 18

Aggregation in Rheomacrodex® nach Enzymbehandlung.

Tabelle 4 Viskositäts- und Aggregationsverhalten enzymbehandelter Erythrozyten in Dextranlösung

Enzyme	η_{rel} bei 160 s^{-1}	η_{rel} bei 8 s^{-1}	η_{intr} (sec^{-1})	t 1/2 (sec)
Kontrolle	1,84	2,94	0	∞
Trypsin	2,84	4,42	195	0,7
Chymotrypsin	2,76	5,47	66	1,3
Neuraminidase	3,23	>6,90	238	0,9
Pronase	3,57	>6,00	44	2,5

enzymbehandelte Erythrozyten in 10 % Dextran 40.000(Rheomacrodex)®
Hct 45 %, 37°C, $\eta = 3,8 \text{ cP}$

Suspendierte man enzymbehandelte (Trypsin, Pronase) Erythrozyten in Lösungen von Dextran 20 000, 10 000, so fand sich nur dann eine Zellaggregation, wenn die übliche Zumischung von Albumin unterblieb. Unmittelbar nach Zugabe der Zellen in die Dextranlösung fand sich eine typische Aggregation in Geldrollenform, teilweise in Klumpen (Pronase); sofort setzte jedoch auch eine spontane Stechapfelbildung ein. Letztere wiederum machte eine Quantifizierung der Aggregation in unseren Systemen unmöglich, da eine rasche Veränderung aller Meßdaten mit der Zeit eintrat. Wir können also die Befunde von JAN u. CHIEN bestätigen, sind jedoch auf subjektive Beobachtung angewiesen.

Bemerkenswerterweise verhinderte eine Beimischung von 1 g % Albumin die Aggregation enzymbehandelter Zellen in Dextran 10 000 völlig und in Dextran 20 000 zum größten Teil. Dies lag in diesem Fall nicht daran, daß sich Stechapfel ausbildeten, sondern offenbar an einem anderen Effekt. Es bleibt späteren Versuchen vorbehalten, die interessante Möglichkeit zu verfolgen, daß das Albuminmolekül eine durch kurzkettige Dextrane bei Reduktion der Zellladung auslösbare Aggregation verhindert. In reinen Albuminlösungen fand sich in keinem Fall ein Hinweis auf Aggregation enzymbehandelter Zellen, obwohl das Molekül deutlich größer ist als die mittlere Größe der Dextranmoleküle in Dextran 10 000- und Dextran 20 000-Lösungen.

Der Einfluß von Dextranmolekülen auf die Abhängigkeit der Aggregation von der Ladung wurde auch in Systemen untersucht, bei welchem natives Plasma mit 10 %iger Dextranlösung verdünnt wurde.

Tabelle 5 Erythrozytenaggregation in
Plasmaverdünnungen 1:10 (1g% Dextran)

Dextran Mol.Gew.	Kontrolle		Trypsin	
	T _{min} (sec ⁻¹)	t 1/2 (sec)	T _{min} (sec ⁻¹)	t 1/2 (sec)
60.000	44	1,7	91	1,4
40.000	17	2,9	100	0,4
20.000	7	>10	44	1,6
10.000	16,5	>10	54	2,7

Dieses System eignet sich deswegen besonders gut, weil in ihm die Zellen weitgehend in einem physiologischen Milieu verbleiben. Es hat allerdings den Nachteil, daß angesichts der physiologischen Variabilität in der Konzentration adhäsiver Proteine die absoluten Meßwerte erhebliche Schwankungen aufwiesen. Dem steht aber der Vorteil gegenüber, daß die Fließeigenschaften, d.h. vor allem die Verformbarkeit der Zellen, erhalten blieben.

In unseren Versuchen wurde das Plasma wie folgt verändert: jeweils 1 ml einer 10%igen isotonischen Dextranlösung wurden 9 ml Plasma zugesetzt. Dadurch wurde die Konzentration der natürlichen adhäsiven Kolloide um 10 % reduziert und gleichzeitig Dextrane mit einem mittleren Molekulargewicht zwischen 10 000 und 60 000 in einer Konzentration von 1 % [g/Vol] zugesetzt. Infolge dieser Verdünnung mit Zugabe von Dextran wurde die Aggregation der nicht behandelten Kontrollzellen bei Dextran 60 nur unerheblich, bei allen niedermolekularen Dextranen aber hochsignifikant reduziert, was sich auch in einer Abnahme der scheinbaren Viskosität bei allen Schergraden äußerte. Ganz anders dagegen verhielten sich die enzymbehandelten Zellen. Hier fand sich bei Dextran 60 000 keine nennenswerte Änderung, bei Dextran 40 000 und 20 000 eine deutliche Steigerung gegenüber den unbehandelten Kontrollen, bei Dextran 10 000 war das Verhalten von Kontrollen und behandelten Zellen nahezu identisch.

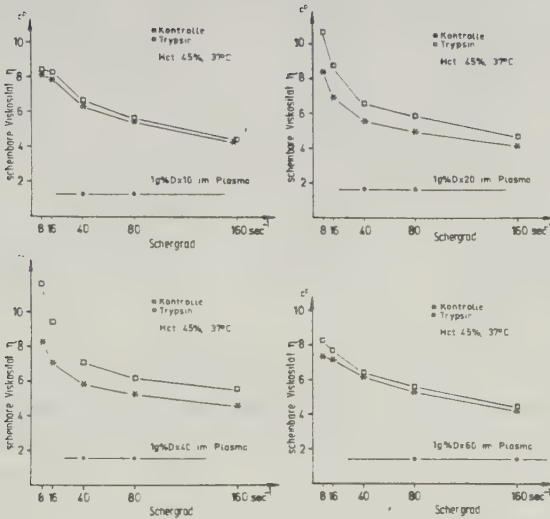


Abb. 19

Viskosität in verdünntem Plasma (durch Hinzufügen einer 10%igen Dextran-Lösung mit verschiedenen Molekulargewichten). Die Dextran-Konzentration beträgt dabei 1 g%. Die Erythrozyten wurden mit Trypsin behandelt.

Die Zugabe der halben Menge Dextran (0,5 %) ergab bei Kontrollzellen eine in etwa entsprechend geringere Viskositätsänderung, bei trypsinbehandelten Zellen eine Zunahme der Viskosität bei Dextran 20 000 und 40 000, nicht dagegen bei Dextran 60 000 und 10 000. Die Zugabe der Dextrane in den hier verwendeten Konzentrationen führte zu keiner signifikanten Veränderung der E.B. der Zellen im Plasma-Dextrangemisch gegenüber der in reinem Plasma.

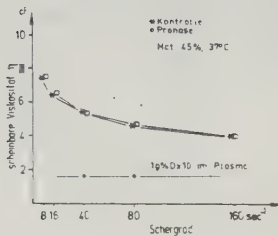


Abb. 20

Änderung der Viskosität nach Pronasebehandlung in Plasma mit 1 g% Dx 10.

Die Befunde können wie folgt gedeutet werden: bei unbehandelten Zellen steht die Verdünnung des Plasmas ganz im Vordergrund. Geschieht dies mit einer Dextranlösung, die in etwa die gleichen adhäsiven Eigenschaften aufweist wie das durch sie ersetzte Plasma, ändert sich an der Viskosität nichts wesentliches. Verwendet man Lösungen mit geringerem Molekulargewicht, so kommt es lediglich zur Hemmung der Aggregation, wobei unklar ist, ob dies ein Verdünnungseffekt oder ein zusätzlicher aggregationshemmender Effekt ist. Ganz anders verhalten sich dagegen enzymbehandelte Zellen. Analog zu den Befunden in reinen Dextranlösungen zeigt sich auch hier eine sehr deutliche Steigerung der Aggregabilität bei Dextran 60 000, 40 000, 20 000 und 10 000. Die Geschwindigkeit der Aggregatbildung und die Scherungsresistenz nahmen deutlich zu. Unter dem Einfluß von Chymotrypsin und Pronase führte sogar die Zugabe von Dextran 10 000 (1 %) ebenfalls zu einer deutlichen Aggregationszunahme. Wie der Vergleich von Abb. 18 und 20 und Tabelle 5 zeigen, ist wiederum die photometrische Aggregometrie das wesentlich empfindlichere Instrument als die Viskosimetrie, um Unterschiede im mikro-rheologischen Verhalten von Erythrozytenaggregaten nachzuweisen. Mit Hilfe der hier verwendeten Technik konnte somit zweifelsfrei belegt werden, daß die Verminderung der Zellladung nicht nur zur Folge hat, daß die Adhäsions- und Aggregationsbedingungen für die vorhandenen Makromoleküle des Blutes gesteigert werden, sondern darüber hinaus kleinere, -nicht zur Aggregation befähigte bzw. diese sogar störende- Kolloide nunmehr eine adhäsive Wirkung entfalten können.

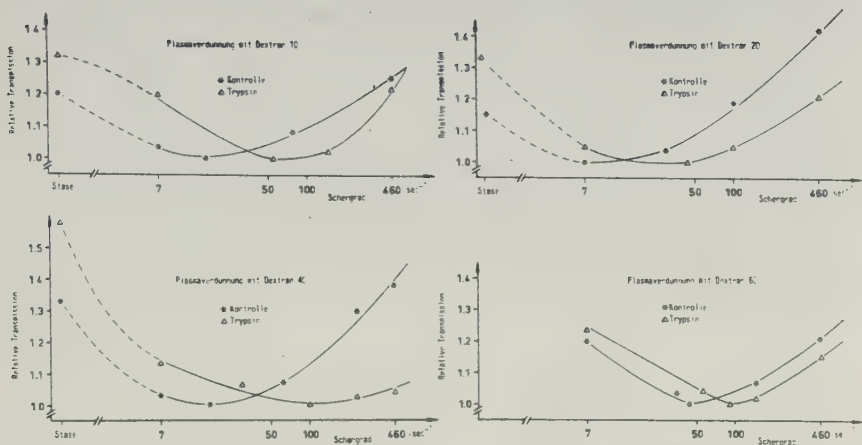


Abb. 21

Aggregationsverhalten trypsinbehandelter Erythrozyten in Plasma-verdünnung mit Dextranen verschiedenen Molekulargewichts.

Es muß allerdings gleich festgehalten werden, daß Albumin dieser Regel nicht folgt. Es bleibt unklar, warum Dextrane mit einem Molekulargewicht von 10 000 eine Aggregationssteigerung auslösen können, nicht dagegen Albumine mit einem mittleren Molekulargewicht von 69 000. Als mögliche Ursachen für dieses differente Verhalten kommen Parameter wie starke Ladung oder Molekülform in Frage; wobei üblicherweise davon ausgegangen wird, daß Dextrane im Mittel eher als gestreckte Moleküle vorzuliegen scheinen. Für die Vorstellung, daß entweder einige wenige größere Moleküle oder aber eine insgesamt andere Molekülkonfiguration für die unterschiedlichen Effekte von Albumin und Dextran auf enzymbehandelte Zellen verantwortlich sind, spricht auch die Beobachtung von VOLGER in unserem Labor (unveröffentlicht), daß mit Neuraminidase behandelte Erythrozyten in einer Lösung mit Albumin-Polymerisaten (ausgelöst durch Reduktion der Salinität) eine Aggregation auslösen können.

5. Auswirkung der Enzymbehandlung auf die Verformbarkeit der Erythrozyten

Da durch die Enzymbehandlung auch bei 160 sec^{-1} , d.h. bei einem Schergrad, welcher die meisten Aggregate dispergiert, die scheinbare Viskosität erhöht war, tauchte der Verdacht auf, daß möglicherweise nicht allein die Aggregation gesteigert, sondern auch die Verformbarkeit der Erythrozyten beeinträchtigt sein könnte. Dieser Verdacht wurde dadurch überprüft, daß die mittlere Passagezeit der unbehandelten und der behandelten Erythrozyten nach der oben beschriebenen Methode von SCHLICK (38) gemessen wurde.

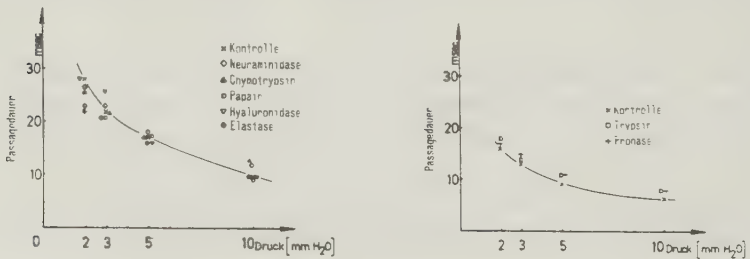


Abb. 22

Verformbarkeit der Erythrozyten nach Enzymbehandlung. Alle Messungen in Richtung des elektrischen Feldes.

Wie Abb. 22 zeigt, kam es bei Drucken zwischen 10 mm und 2 mm H₂O zu keiner signifikanten Veränderung der in einer 1%igen Albuminlösung suspendierten Zellen. Es muß allerdings zugegeben werden, daß möglicherweise in plasmatischem Milieu nach Enzymbehandlung doch eine Beeinträchtigung der Verformbarkeit auftreten könnte. Aus versuchstechnischen Gründen konnten nicht alle Versuche mit inkubierten Erythrozyten an einem Tag durchgeführt werden. Deshalb mußten mehrere einzelne Diagramme angefertigt werden mit jeweils eigener Kontrollmessung. Nur auf diese Weise ließ sich ein Vergleich mit den enzymbehandelten Erythrozyten durchführen.

Wie die Abbildung 22 zeigt, ergibt sich keine signifikante Änderung der Passagedauer und damit der Verformbarkeit der Erythrozyten. Sie behalten ihre mechanischen Eigenschaften weitgehend

bei und werden durch die Enzymbehandlung nicht rigide.

V. DISKUSSION

Der Zusammenhang zwischen Oberflächenladung von Zellen und Zelladhäsionsphänomenen ist in der Vergangenheit vielfach untersucht worden (siehe z. B. CURTIS u. UHLENBRUCK) (15, 36, 37, 52, 55). Beim Erythrozyten muß hierbei ausdrücklich unterschieden werden zwischen sogenannter Agglutination und Aggregation. Unter ersterer verstehen wir die durch spezifische inkomplette oder komplette Antikörper ausgelöste irreversible Zellverklebung, unter letzterer die reversible Bindung von Erythrozyten in Form lockerer Aggregate (siehe Seite 2). Die vorliegende Abhandlung bezieht sich lediglich auf letzteren Vorgang. Um Aussagen über den Mechanismus der Erythrozytenaggregation machen zu können, ist es notwendig, möglichst viele relevante Parameter zu erfassen. Es ist deshalb notwendig, sich eine Modellvorstellung über diesen Vorgang zu schaffen.

Insgesamt kann man sich drei Arten von Bindung vorstellen (15) :

1. Molekularer oder geschlossener Kontakt durch Brown'sche Molekularbewegung für kleinste Körper. Dieser dürfte durch Scherkräfte kaum zu lösen sein (Spaltbreite: 0-5Å)

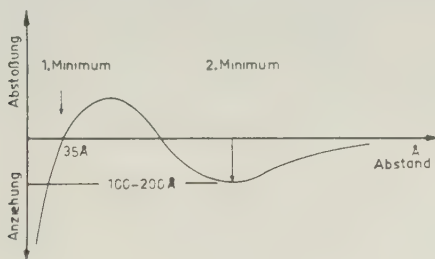


Abb. 23

2. Adhäsion im zweiten Minimum

Sie findet bei Partikeln mit Oberflächenladung statt. Dabei ist charakteristisch:

- a) Adhäsion nur zwischen großen Körpern ($>500 \text{ Å} - 2000 \text{ Å}$).

- b) Es wird immer ein Spalt gefunden.
- c) Stärke der Adhäsion hängt von Oberflächenpotential und der Ionenstärke ab.
- d) Redispersion ist leicht wegen niedriger Adhäsions-Energie.

3. Adhäsion durch Brückenbildung

Dabei binden Moleküle aus dem umgebenden Medium zwei Körper aneinander. Parameter sind pH-Wert, Ionenstärke und chemische Spezifität.

Für sehr kleine Körper, wie Viren und große Makromoleküle, reicht die Brown'sche Molekularbewegung aus, um große Energieschranken, wie sie z.B. eine Zelloberfläche darstellt, zu durchdringen oder sich auf ihr festzusetzen.

Bei größeren Körpern, wie Bakterien, tierischen Zellen oder auch Erythrozyten reicht die Bewegungsenergie nicht aus, um den Kontakt zwischen den Körpern zustande zu bringen. Ein Zellkontakt kommt nur dann zustande, wenn man annimmt, daß solche relativ großen Körper kleine Fortsätze haben, welche dann ihrerseits in der Lage sind, die Energieschranke zu durchbrechen.

Es gibt nun aber mehrere Bedenken gegen die Annahme, daß durch kleine Fortsätze etwa nach Art von Mikrovilli allein schon ein Zellkontakt zustande kommt. So müßte etwa die Beweglichkeit dieser Mikrovilli fast völlig uneingeschränkt sein, jeweils zwei Mikrovilli müßten sich in Achsenrichtung aneinanderlagern und die für kugelförmige kleine Partikel bekannten Beziehungen zwischen Impuls und elektrostatischer Repulsion müßten auch für zylindrische Körper gelten. Keine dieser Annahmen kann heute als gegeben angesehen werden.

Mit der Mehrzahl der Autoren (siehe CHIEN) (9,10) muß man davon ausgehen, daß die physiologische Aggregation von Erythrozyten in Rouleaux eine Adhäsion im Bereich des zweiten Minimums ist und durch die Vermittlung von Makromolekülen zustande kommt, welche die Zone starker elektrostatischer Abstoßungskräfte in der Nähe der Membran überbrücken. Ob allerdings diese Annahme auch noch für die nach Enzymbehandlung (besonders nach Pronase) gilt, ist zweifelhaft und muß späteren Untersuchungen vorbehalten bleiben (siehe auch Hinweis DANON (16)).

Um die Bindung zwischen zwei benachbarten Erythrozytenflächen in einem gestreckten Rouleaux zu erklären, postulierte CHIEN folgende These (9,10), welche ein Gleichgewicht verschiedener Kräfte annimmt:

$$F_{agg} = F_b - F_e - F_s$$

F_{agg} = Aggregationskraft, F_b = Brückenbildungskraft,
 F_e = elektrische Abstoßung, F_s = Scherkraft

Insgesamt stellen unsere Befunde eine Bestätigung der CHIEN'schen Vorstellung dar und tragen auch zur theoretischen Erweiterung bei, da in unserem experimentellen Ansatz die Messung von F_s erstmals möglich ist. Fällt F_s weg, d.h. befindet sich die Suspension in Stase, so stellt sich tatsächlich ein Gleichgewicht zwischen F_b und F_e in dem Sinne dar, daß oberhalb einer bestimmten Konzentration von brückenbildungsfähigen Makromolekülen F_{agg} einen positiven Wert einnimmt. Ist allerdings $F_s \neq 0$, dann spielt die Art der Bindung insofern eine Rolle, als die Sekundäraggregate sich qualitativ völlig unterschiedlich verhalten können (Netzaggregation bzw. Klumpenaggregation).

Die Kraft der elektrostatischen Abstoßung zwischen zwei gleichnamig geladenen Teilchen ist von OVERBEEK 1952 berechnet worden(4) Danach ist diese Kraft proportional dem Oberflächenpotential bzw. der Dicke der elektrostatischen Doppelschicht und nimmt exponentiell mit der Entfernung vom Sitz der Ladung ab. Auf Erythrozyten übertragen heißt das: da sie negativ geladen sind (Zetapotential ca. -13,8 mV), stoßen sie sich ab und zwar mit einer Kraft, die dem Produkt ihrer Ladungen direkt und dem Quadrat ihres Abstandes indirekt proportional ist. Daraus ergibt sich, daß mit abnehmender Ladung der Abstand zwischen den Erythrozytenmembranen kleiner wird bis sich wieder ein Gleichgewicht zwischen aggregierenden und dispergierenden Kräften eingestellt hat. Bei größerem Abstand zwischen den Membranen zweier Erythrozyten spielt die Ladung eine immer geringere Rolle wegen deren exponentieller Abnahme; dementsprechend können sehr große Moleküle auch noch in verhältnismäßig geringer Konzentration eine Zellbindung auslösen.

Die Beziehungen zwischen Erythrozytenaggregation und Zetapotential sind in der Vergangenheit vielfach untersucht worden (1,15,21,25,32,34,36,37). So fanden z.B. SACHTLEBEN u. RUHEN-STROHT-BAUER (37) bei Neuraminidasebehandlung von Erythrozyten eine Abnahme der Agglutination mit Anti-A-Isoagglutininen jedoch eine Zunahme der Zell-"Agglomeration", wie die Zellen in einem Plasma eines Patienten mit hoher Blutkörperchensenkungsgeschwindigkeit resuspendiert wurden. Dagegen fanden JAN u. CHIEN (21) nach Neuraminidasebehandlung keine Veränderung in der Zellaggregabilität, wenn die Zellen in Fibrinogenlösung suspendiert wurden und die Aggregation mit einer subjektiven Zählmethode quantifiziert wurde. Dagegen fanden die gleichen Autoren eine deutliche Zunahme der Aggregabilität, besonders bei niedermolekularen Dextranen (Dx 40 und Dx 20) nach Neuraminidasebehandlung. Numerische Werte für das Zetapotential sind in dieser Arbeit nicht angegeben. Unsere eigenen Versuche ergeben ebenfalls keine einheitliche Beziehung zwischen Zellaggregation und Zellbeweglichkeit. Vielmehr zeigen sich erhebliche Unterschiede zwischen den Effekten der einzelnen Enzyme, außerdem erhebliche Unterschiede der gleichen Enzymbehandlung bei Resuspension der Erythrozyten in verschiedenen Plasmen.

Durch die Behandlung der Erythrozyten mit verschiedenen Enzymen konnte die Ladung bis auf maximal 25 % des Kontrollwertes herabgesetzt werden, es war aber keineswegs so, daß die stärkste Reduktion der Ladung auch die stärkste Erhöhung der Zellaggregation hervorrief. Im einzelnen fanden wir folgende Beziehung:

1. CHYMOTRYPSIN ergab eine Ladungserniedrigung auf ca. 85 %, aber in der Regel bei Resuspension der Zellen in Plasma keine signifikante Steigerung der Aggregation. Resuspension in Dextran ergab jedoch eine gesteigerte Aggregation.

2. TRYPSIN

Die Ladung wurde im Mittel auf ca. 55 % der Kontrolle reduziert. Gleichzeitig zeigte sich auch eine deutliche Aggregationserhöhung, sowohl bei Resuspension im Plasma als auch bei Resuspension in Dextranlösungen bzw. Plasma-Dextrangemischen.

3. PRONASE führte zu etwa 50 % Ladungserniedrigung und ergab in allen untersuchten Suspensionsmedien eine maximale Aggregation, teilweise Agglutination von Erythrozyten. Unabhängig vom Suspensionsmedium und unabhängig vom gewählten Aggregationsparameter hatte Pronase durchweg den stärksten hämorrheologischen Effekt.

4. NEURAMINIDASE produzierte die stärkste Herabsetzung der Ladung (auf ca. 25 %). Der Effekt auf die Aggregation war jedoch durchaus variabel. In der Regel war bei Resuspension der Zellen keine nennenswerte Steigerung der Aggregation, gelegentlich sogar eine Reduktion zu verzeichnen. Bei einem Patienten (er litt an einer arteriellen Gefäßerkrankung) kam es jedoch zu einer hochsignifikanten Steigerung der Aggregation nach Neuraminidasebehandlung, obwohl das gemessene Zetapotential um etwa den üblichen Betrag abgenommen hatte. Bei früheren Versuchen mit wesentlich höherer Neuraminidasekonzentration ist in unserem Labor bereits einmal in Zusammenarbeit mit MEHRISHI (unveröffentlichte Befunde) eine deutliche Steigerung der Aggregation festgestellt worden, obwohl die Reduktion des Zetapotentials etwa ebenso stark war wie in den jetzigen Versuchen. Die Ursache für die Diskrepanz der Befunde nach Neuraminidasebehandlung bedarf weiterer Klärung.

Wie lassen sich nun diese Ergebnisse mit der Formel von CHIEN in Übereinstimmung bringen? Sicher ist nach unseren Befunden, daß durch die Enzymbehandlung mehr als nur das Oberflächenpotential der Erythrozyten verändert wurde. Dies wird besonders deutlich, wenn man die Befunde nach Pronase- und Trypsinbehandlung miteinander vergleicht und berücksichtigt, daß pronasebehandelte Zellen in salinem Milieu (1 % Albumin) und in plasmatischem Milieu sich vollständig anders verhalten. Die außerordentlich starke Verklumpung von Zellen nach Pronasebehandlung dürfte vermutlich darauf beruhen, daß dieses Enzym sehr grobe Veränderungen in der Zellperipherie der Erythrozyten verursacht, welche jedoch vor allem in Anwesenheit von plasmatischen Makromolekülen rheologisch wirksam werden. Man könnte also sagen, daß Trypsin und Pronase einen zwar etwa gleichen Einfluß auf F_e haben, aber einen offenbar völlig ungleichen auf F_{agg} . Daraus muß zwingend der Schluß gezogen werden, daß auch F_b verändert sein muß. Es ist wohl naheliegend anzunehmen, daß die verschiedenen Enzyme eben nicht nur die Ladung, sondern ganz bestimmte tiefer ge-

legene Abschnitte der Erythrozytenmembran mit der Ladung abtrennen. Dadurch werden Membranstrukturen, die für die Brückenbildung verantwortlich sind, vermutlich ebenfalls mit verändert. Die verschiedenen Enzyme dürften in dieser Hinsicht sehr unterschiedliche Wirkungen entfalten, was lediglich durch zusätzliche Untersuchungen neben der Messung der elektrophoretischen Wanderungsgeschwindigkeit geklärt werden kann. Zu diesem Thema sind in letzter Zeit eine große Vielzahl von Arbeiten erschienen, welche sich mit den Veränderungen in dem immunologischen Verhalten (UHLENBRUCK) bzw. in dem Grenzflächenverhalten befassen (siehe z.B. PASSOW, (60)

Durch Neuraminidase wird eine stark negativ geladene Carboxylgruppe (pK 2,8 !) (28,55) abgetrennt, die vermutlich gleichzeitig als Rezeptor fungiert, d.h. Bindeglied für die Anheftung bestimmter Makromoleküle ist. Man könnte sich also vorstellen, daß, wie dies für Iso-Agglutination und die Agglutination mit inkompletten Antikörpern bereits von POLLACK (32) diskutiert wurde, eine verminderte Abstoßung F_e in etwa durch eine verminderte Brückenkraft F_b ausgeglichen wird. Nach CHIEN hat man F_b aufzufassen als Funktion dreier Einzelkräfte, nämlich

$$F_b = F(f) \times (a) \times (n)$$

wobei: f = Kraft pro Bindung, a = Zahl der Bindungen pro Molekül und n = Zahl der Bindungen pro Zellpaar bedeutet.

Unter der Annahme, daß außer der elektrostatischen Abstoßung auch die Komponenten der Brückenkraft verändert werden, lassen sich die in unserer Untersuchung erhobenen unterschiedlichen Befunde hinsichtlich der Aggregation bei etwa gleicher Ladungsreduktion zwanglos erklären.

Die äußerst starke Aggregation nach Pronasebehandlung, die so scherungsresistent ist, daß das Kriterium der Reversibilität nicht immer sicher gegeben ist, (die man auch als eine Art Agglutination bezeichnen könnte) ist offenbar ein besonders gutes Beispiel dafür, daß in der Anwesenheit von Plasmaproteinen eine enzymbehandelte Zelle trotz der Reduktion der Oberflächenladung um nur 50 % maximal adhäsiv werden kann. Ob für dieses Phänomen die Kraft der Einzelbindung oder die Zahl der Bindungen insgesamt verantwortlich ist, kann zur Zeit nicht sicher entschieden werden. In diesem Zusammenhang soll noch einmal auf die Befunde von DANON (16) verwiesen werden, der

nach Pronasebehandlung auch positiv geladene Proteinklumpen zwischen agglutinierten Erythrozyten elektronmikroskopisch beobachtete.

Von besonderem Interesse sind die Befunde, die mit enzymbehandelten Zellen in Dextranen mit mittlerem und niederem Molekulargewicht erhoben wurden. Seit längerer Zeit ist bekannt, daß normale Erythrozyten in Dextranlösungen mit einem mittleren Molekulargewicht von oberhalb 70 000 aggregieren, und zwar umso mehr, je höher das Molekulargewicht (45). Eine detaillierte Abhandlung zu diesem Thema ist unlängst von VOLGER (56) veröffentlicht worden. Desgleichen ist seit längerer Zeit bekannt, daß Dextrane mit einem Molekulargewicht unterhalb von 40 000 die Aggregation normaler Erythrozyten hemmen, wobei bis heute unbekannt ist, ob es sich dabei um einen spezifischen Hemmvorgang oder aber um eine unspezifische Hemmung durch die gleichzeitig erfolgende Dilution des Plasmas handelt. In unseren jetzigen Versuchen fand sich dagegen, daß enzymbehandelte Zellen immer durch niedermolekulares Dextran aggregiert werden. Dieser Befund, welcher weitgehend ähnlichen Befunden von JAN u. CHIEN entspricht, war sowohl in reinen Dextranlösungen zu erheben, als auch - noch klarer - bei Dilutionen von Plasma mit entsprechenden Dextranlösungen. Es ist außerdem bemerkenswert, daß der Effekt schon bei sehr niedrigen Konzentrationen (1 %) auftrat, bei denen allerdings nach SEAMAN (50) auch noch keine deutliche Steigerung des Zeta - Potentials durch die Dextranmoleküle selbst zu erwarten ist. Eine Aggregationssteigerung mit Dextran 10 000 ist unseres Wissens bisher noch nicht beschrieben worden. Die Beziehung zwischen Molekülgröße und Aggregation sind für Dextranmoleküle vor allem durch SEAMAN und BROOKS (6), JAN und CHIEN (21), VOLGER et al. (56) untersucht worden.

CHIEN hat als erster erkannt, daß eine Beziehung besteht zwischen dem Molekulargewicht aggregierender Dextrane und der Breite des Spalts, welche sich zwischen zwei benachbarten Erythrozyten in einem Rouleau elektronenmikroskopisch feststellen ließ. Aus diesen Untersuchungen, welche hinsichtlich der absoluten Molekülgröße nicht festgelegt sind, schloß CHIEN, daß für eine Aggregation von Erythrozyten eine bestimmte minimale Molekülgröße im umgebenen Medium vorhanden sein muß, welche sich an beide Erythrozytenflächen anlegt und dadurch trotz der vorhandenen elektrischen Abstoßung als

Brückenglied den Raum zwischen den Erythrozyten auszufüllen vermag. CHIEN nahm ferner an, daß die Spaltbreite immer geringer ist als die korrespondierende Länge der Dextranmoleküle, da er annahm, daß die Enden der Makromoleküle auf die Oberfläche adsorbiert werden(11).

Der Befund einer gesteigerten Aggregation enzymbehandelter Zellen in Dextranlösungen mit einem Molekulargewicht unter 40 000 läßt sich nun dadurch erklären, daß durch die erniedrigte Ladung die Reichweite der elektrostatischen Doppelschicht verringert wird und damit auch der Spalt, der zwischen den Erythrozyten durch das Makromolekül überbrückt werden muß. Diese Annahme ist durchaus mit unseren Befunden zur Deckung zu bringen. Der Befund entspricht auch der seit POLLACK bekannten Agglutination von enzymbehandelten Erythrozyten in salinem Milieu mit sogenannten inkompletten, d.h. relativ niedermolekularen Antikörpern(32).

Somit läßt sich festhalten, daß Aggregation und Oberflächenladung zwar eng zusammenhängen, daß jedoch bei Veränderung der Oberflächenladung durch Enzymbehandlung immer mehrere Faktoren, d.h. Abstoßungskraft und Brückungskraft bzw. deren Einzelkomponenten gleichzeitig verändert werden. Wäre es möglich, allein das Zetapotential zu ändern, könnte die oben geschilderte Hypothese sicher gestärkt werden. Bekanntlich gelingt es, das Zetapotential durch eine Verminderung der Ionenstärke des Mediums zu steigern. Dabei kommt es tatsächlich, wie von JAN u. CHIEN gezeigt wurde, zu einer Verminderung der Zellaggregation. Eine Verminderung des Zetapotentials durch bloße Steigerung der Ionenstärke ist leider für die Arbeit mit Erythrozyten schwer durchführbar, da die Steigerung der Ionenstärke auch die osmotischen Verhältnisse stark verändert, so daß andere Faktoren, die für die Zellaggregation verantwortlich sind, gestört werden (Zellverformbarkeit).

Mit den in dieser Studie verwandten Techniken ist es nicht nur möglich, quantitativ die Kinetik der Zellaggregation, bzw. ihren Einfluß auf die scheinbare Viskosität von Zellsuspensionen zu untersuchen, sondern darüber hinaus auch die qualitativen Veränderungen im Strömungsverhalten stark aggregierender Suspensionen mit Hilfe des FSAR-Wertes zu quantifizieren.

Verklumpung der Erythrozyten durch Seit-zu-Seit-Apposition von Primärrouleaux bei langsamer Strömung ist ein Befund, der sich immer

dann findet, wenn entweder sehr große aggregierende Moleküle vorliegen (α - 2 - Makroglobulin oder Dextran 250 000, (41,45, 56)), oder aber ebenso regelmäßig nach Pronasebehandlung; gelegentlich nach Trypsinbehandlung. Diese Zellverklumpung läßt sich durch Anwendung der CHIEN'schen Theorie auf die Erythrozytenadhäsion an Verzweigungsstellen verstehen. Immer dann nämlich, wenn entweder besonders große Moleküle in der Lösung vorliegen und damit die Reichweite der Brückenmoleküle erhöht ist, kommt es auch unter den etwas ungünstigeren Bedingungen, die zwischen zwei nebeneinander liegenden Geldrollen herrschen, zu dichter Aneinanderlagerung. Diese wird durch langsame Strömung offenbar begünstigt. Die normalen Brückenkräfte, etwa von Fibrinogen in physiologischen Konzentrationen oder von Dextranen mit einem Molekulargewicht bis 110 000 (45) reichen offenbar lediglich für eine ausreichend starke Zelladhäsion aus, wenn zwei Erythrozyten mit einer maximal großen gemeinsamen Fläche aneinander gelagert sind. An Verzweigungen oder an den Seitenflächen von Geldrollen sind die Adhäsionsbedingungen normalerweise so ungünstig, daß nur eine Abnahme der Zellladung und/oder Zunahme der Brückenbildung eine feste Bindung erlaubt. Wenn sich die Klumpen einmal in langsamer Strömung gebildet haben, rotieren sie in ihr und damit wird verständlich, daß ihre hydrodynamische Dispersion deutlich erschwert ist ($\delta T_{\min}$ steigt an). Diese Befunde lassen sich nur damit erklären, daß man annimmt, daß unter dem Einfluß proteolytischer Enzyme mindestens zwei für die Aggregation von Erythrozyten relevante Größen verändert werden. Da für keine der Aggregationsparameter eine direkte Beziehung zwischen Oberflächenladung und Aggregationskraft bestand, muß angenommen werden, daß durch Enzymbehandlung auch brückenbildende Kräfte an der Erythrozytenmembran verändert wurden. Hierbei ist es am wahrscheinlichsten, daß die Bindung der Makromoleküle begünstigt wurde. Diese Deutung erklärt auch die Variabilität der Aggregationssteigerung durch ein beliebiges Enzym bei unterschiedlich starker Aggregations-tendenz verschiedener Plasmen.

ZUSAMMENFASSUNG

Unter Verwendung neuartiger hämorrheologischer Methoden wurde der Zusammenhang zwischen elektrischer Oberflächenladung der Erythrozyten und der Zellaggregation vor und nach Behandlung mit verschiedenen protolytischen Enzymen untersucht. Die Messungen der elektrischen Oberflächenladung des Erythrozyten wurden in einer Elektrophoresekammer nach MEHRISHI durchgeführt. Die Aggregation wurde durch Viskosimetrie in einem WELLS-BROOKFIELD-Mikroviskosimeter mit Mooney-Kammer, die Aggregation photometrisch in einer Platte-Kegel-Kammer ("Rheoskop") bei variablen Schergraden durchgeführt. Die Erythrozyten wurden durch die Enzyme Trypsin, Chymotrypsin, Neuraminidase, Pronase und Papain in ihrer Ladung verändert, während Elastase und Hyaluronidase keine meßbaren Veränderungen zeigte. Die so behandelten Erythrozyten wurden sowohl im homologen Plasma als auch in verdünntem Plasma sowie in Dextranlösungen verschiedener Molekülgrößen (60 000 bis 10 000) und Albuminlösungen untersucht.

Bei Verwendung verschiedener proteolytischer Enzyme besteht keine einheitliche Beziehung zwischen Oberflächenladung und Aggregation. Steigerung der Aggregation fand sich im wesentlichen nach Einwirkung von Trypsin, Papain und Pronase, die Befunde nach Chymotrypsin und Neuraminidasebehandlung waren stark variabel. Behandlung mit Neuraminidase ergab zwar die stärkste Abnahme der Oberflächenladung, jedoch in der Regel nur eine geringe Aggregation im Plasma und eine etwas deutlichere Aggregation in Dextranlösung. Die stärkste Aggregationssteigerung fand sich nach Pronasebehandlung in allen untersuchten Suspensionsmedien.

In der Regel fand sich durch die gesteigerte Aggregation auch eine gesteigerte scheinbare Viskosität der Zellsuspension (Hämatokrit 45 %, $8-160 \text{ sec}^{-1}$), jedoch ist der prozentuale Anstieg in der Regel wesentlich geringer als die Zunahme der Bildungsgeschwindigkeit und der Scherungsresistenz der Aggregate.

ANHANG

Nach Fertigstellung dieser Arbeit erschien eine Veröffentlichung von CHIEN et al. über einen Patienten, der an einem Mangel an N-Acetyl-Neuraminsäure in der Erythrozytenmembran litt. Diese Ergebnisse stimmen voll mit unseren vorliegenden Befunden überein.

(siehe: CHIEN, S., COOPER, G.W., JAN, K.M., MILLER, L.H., HOWE, C., USAMI, S., LALEZARI, P., N-Acetylneuraminic Acid Deficiency in Erythrocyte Membranes: Biophysical and Biochemical Correlates. Blood 43, 445-460 (1974)).

LITERATURVERZEICHNIS

1. ABDERHALDEN, E., Klinische Enzymologie, Thieme, Stuttgart, 1958
2. BARMAN, Th. E., Enzyme Handbook I, II, Springer, Heidelberg, New York, 1969
3. BANGHAM, A.D., HEARD, D.H., FLEMANS, R., SEAMAN, G.V.F., An Apparatus for Microelectrophoresis of Small Particles, Nature 182, 642-644 (1958).
4. BIER, M., Electrophoresis I, Academic Press, N.Y. 1959.
(Brinton, C.C. u. Lauffer, M.A., The electrophoresis of viruses, bacteria and cells, and the microscope method of electrophoresis. Chap. 10).
5. BROOKS, D.E., SEAMAN, G.V.F., GOODWIN, I.W., Interactions Among Erythrocytes Under Shear, J. Appl. Physiol. 28, 172 - (1970).
6. - , GOODWIN, I.W., SEAMAN, G.V.F., Rheology of Erythrocyte Suspensions: Electrostatic Factors in the Dextran-Mediated Aggregation of Erythrocytes, Biorheology 11, 69-77 (1974).
7. - , SEAMAN, G.V.F., An Electroviscous Effect in the Rheology of Erythrocyte Suspensions, Proc. 1. International Congress of Biorheology, 4-8. IX. 1972, Lyon.
8. CHEN, P.C.Y. u. FUNG, Y.C., Extreme - Value Statistics of Human Red Blood Cells, Microvasc. Res. 6, 32-43 (1973).
9. CHIEN, S., Electrochemical and Ultrastructural Aspects of Red Cell Aggregation, Bibl. Anatomica 11, 244-250 (1973).
10. - , Force Balance at the Surfaces of Aggregating Cells, Bibl. Anatomica 11, 303-309 (1973).
11. - , JAN, K.M., Ultrastructural Basis of the Mechanism of Rouleaux Formation, Microvasc. Res. 5, 155-166 (1973).
12. - , - , USAMI, S., Interaction of Mechanical and Electrochemical Forces in Red Cell Aggregation, 21st. Meeting of the Microcirculation Society 1973, Atlantic City.
13. COOK, G.M.W., HEARD, D.H., SEAMAN, G.V.F., A Sialomucopeptide Liberated by Trypsin From the Human Erythrocyte, Nature 188, 1011-1012 (1960).
14. - , - , - , Sialic Acids and the Electrokinetic Charge of the Human Erythrocyte, Nature 191, 44 - (1961).
15. CURTIS, A.S.G., The Cell Surface, Academic Press, N.Y. 1967.
16. DANON, D., Persönliche Mitteilung an H. Schmid-Schönbein.
17. - , HOWE, C., LEE, L.T., Interaction of Polylysine with Soluble Components of Human Erythrocyte Membranes, Biochim. biophys. Acta 101, 201-213 (1965).
18. DINTENFASS, L., Internal Viscosity of the Red Cell and a Blood Viscosity Equation, Nature 219, 956 - 958 (1968).
19. GOLDSMITH, H.L., Deformation of Human Red Cells in Tube Flow, Biorheology 7, 235-242 (1971).

20. HAYDON, D.A., The Surface Charge of Cells and Some Other Small Particles as Indicated by Electrophoresis. *Biochim. Biophys. Acta* 50, 450-457 (1961)
21. JAN, K.M., Role of the Electrostatic Repulsive Force in Red Cell Interactions. *Bibl. Anatomica* 11, 281-288 (1973)
22. KLOSE, H.J., VOLGER, E., BRECHTELSBAUER, H., HEINICH, L., SCHMID-SCHÖNBEIN, H., Microrheologie and Light Transmission of Blood. I. The Photometric Effects of Red Cell Aggregation and Red Cell Orientation. *Pflügers Arch.* 333, 126-139 (1972)
23. KOK, D.A., MEHRISHI, J.N., SEAMAN, G.V.F., Some Comments on the Electrophoretic Mobility of Human Red Blood Cells in Disease. *Sangre* 9, 231-234 (1964)
24. LARCAN, A., STOLTZ, J.F., *Microcirculation et Hemorheologie*. Paris (Masson) , 1970
25. - , - , Propriétés électrokinétiques des éléments figures du sang humaine (globules rouges, plaquettes, lymphocytes), *Biorheology* 10, 189 (1973)
26. MARIKOVSKI, Y., DANON, D., KATCHALSKY, A., Agglutination by Polylysine of Young and Old Red Blood Cells. *Aerospace Medical Research Laboratories*, 1966.
27. MEHRISHI, J.N., Charakterisierung biologischer Oberflächen durch Zellelektrophorese. *Das Ärztliche Laboratorium* 18, 225-229 (1972)
28. - , Molecular Aspects of the Mammalian Cell Surface. *Progr. Biophys. and Molec. Biol.* 25, 19-24 (1972)
29. - , SEAMAN, G.V.F., Temperature Dependence of the Electrophoretic Mobility of Cells and Quartz Particles. *Biochim. Biophys. Acta* 112, 154 (1966)
30. MEISTERMANN, H.J., MERRILL, E.W., SALZMAN, E.W., GILLILAND, E.R., PELLETIER, G.A., Effect of Dextran on Rheology of Human Blood: Low Shear Viscometry. *J. Appl. Physiol.* 22, 480-486 (1967)
31. MORIHARA, K., TZUZUKI, H., A Trypsin-Like Protease from *Streptomyces Fradiae*. *Arch. Biochem. Biophys.* 126, 71 (1968)
32. POLLACK, W., Some Physicochemical Aspects of Hemagglutination. *Ann. New York Acad. Sci.* 127/II, 892-900 (1965)
33. RAMPLING, M., SIRS, J., The Interactions of Fibrinogen and Dextran with Erythrocytes. *J. Physiol.* 223, 199-212 (1972)
34. RESNITZKI, P., YAARI, A., DANON, D., Biophysical Characteristics of Erythrocytes During Acute Myocardial Infarction and Venous Thrombosis. *Thrombos. Diathes. haemorrh.* 28, 524 (1972)
35. RUHENSTROTH-BAUER, G., Mechanismus und Bedeutung der beschleunigten Erythrozytensenkung. *Klin. Wschr.* 44, 533-539 (1966)
36. - , STRAUB, E., FUHRMANN, G.F., SACHTLEBEN, P., Die elektrophoretische Beweglichkeit von Blutzellen beim Gesunden und bei Kranken. *Münch. Med. Wschr.* 103, 794-797 (1961)

37. SACHTLEBEN, P., RUHENSTROTH-BAUER, G., Agglutination and the Electrical Surface Potential of Red Blood Cells. *Nature* 192, 82- (1961)
38. SCHLICK, W., SCHMID-SCHÖNBEIN, H., Measurement of single red cell deformability. *Blood Cells Vol. I*, 2, 1975 im Druck
39. SCHMID-SCHÖNBEIN, H., Hemodynamic Significance of Red Cell Fluidity. *Proc. 6th. Europ. Conf. Microcirc.*, Aalberg 1970 Karger (1970)
- 40.- , Einführung in die Hämorheologie: Fließeigenschaften, Fließbedingungen und Methodik. *Phlebol. u. Proktol.* 2, 205-226 (1973)
- 41.- , GALLASCH, G., VOLGER, E., KLOSE, H.J., Microrheology and Protein Chemistry of Pathological Red Cell Aggregation (Blood Sludge) Studied in Vitro. *Biorheology* 10, 213-227 (1973)
- 42.- , v. GÖSEN, J., HEINICH, L., KLOSE, H.J., VOLGER, E., A Counter-Rotating "Rheoscope Chamber" for the Study of the Micro-rheology of Blood Cell Aggregation by Microscopic Observation and Microphotometry. *Microvasc. Res.* 6, 366-376 (1973)
- 43.- , HEINICH, L., A Simple Device Allowing Blood Viscometry at Low Shear rates with the Wells-Brookfield-Viscometer. *Res. exp. Med.* 161, 49-57 (1973)
- 44.- , KLINE, K.A., HEINICH, L., VOLGER, E., FISCHER, T., Micro-rheology and Light Transmission of Blood. III. The Velocity of Red Cell Aggregate Formation. *Pflügers Arch.* 354, 299-317 (1975).
- 45.- , KLOSE H.J., VOLGER, E., Effect of Colloidal Plasma Substitutes on Microrheology of Human Blood. *Int. Sympos. Rottach-Engern*, Basel New York, Karger (1971)
- 46.- , VOLGER, E., KLOSE, H.J., Microrheology and Light Transmission of Blood II. The Photometric Quantification of Red Cell Aggregate Formation and Dispersion in Flow. *Pflügers Arch.* 333, 140-155 (1972)
- 47.- , WELLS, R.E., GOLDSTONE, A., Fluid Drop-Like Behaviour of Erythrocytes Disturbance in Pathology and its Quantification. *Biorheology* 7, 227-234 (1971)
- 48.- , WELLS, R.E., Rheological Properties of Human Erythrocytes and Their Influence upon the "Anomalous" Viscosity of Blood. *Ergebn. Physiol.* 63, 145-219 (1971)
49. SEAMAN, G.V.F., in: *Cell Electrophoresis* (J. Ambrose, Ed.) London (Churchill) 1965, p440-445.
- 50.- , HEARD, D.H., The Surface of the Washed Human Erythrocyte as a Polyanion. *J. Gen. Physiol.* 44, 25-27 (1960)
- 51.- , JACKSON, L.J., UHLENBRUCK, G., Action of the Amylase Preparations and Some Proteases on the Surface of Mammalian Erythrocytes. *Arch. Biochem. and Biophys.* 122, 605-613 (1967)
- 52.- , UHLENBRUCK, G., Die elektrophoretische Beweglichkeit von Erythrozyten nach Behandlung mit verschiedenen Enzymen und Antiseren. *Klin. Wschr.* 40, 699-701 (1962)

53. STOLTZ, J.F., STOLTZ, M., PETERS, A., STREIFF, F., LARCAN, A.,
Influence des differentes constituants plasmatiques sur le
potentiel zeta des erythrocytes humains. C.R.Soc. de Biol.
Extrait du Tome 163, n° 7, 1605- (1969)
54. TKACZEWSKI, W., ZIELONKA, Z., The Effect of Dextran 3000 on
the Rate of Sedimentation and Aggregation of Erythrocytes.
Blood 41, 728-729 (1973)
55. UHLENBRUCK, G., SEAMAN, G.V.F., COOMBS, R.R.A., Factors In-
fluencing the Agglutinability of Red Cells.III. Physico-Chemi-
cal Studies on Ox Red Cells of Different Classes of Agglutin-
ability. Vox. Sang. 12, 420- (1967)
56. VOLGER, E., SCHMID-SCHÖNBEIN, H., KLOSE, H.J., Rheological
Studies on the Kinetics of Arteficial Red Cell Aggregation
Induced by Dextrans. Bibl. Anat. 11, 83-91 (1973)
57. - , - , v.GOSEN, J., KLOSE, H.J., KLINE, K.A., Microrheo-
logy and Light Transmission of Blood.IV. The Kinetics of
Arteficial Red Cell Aggregation Induced by Dextrans. Pflüg.
Arch. 11, 111-111 (1974)
58. YAARI, A., Mobility of Human Red Blood Cells of Different Age
Groups in an Electric Field. Blood 33, 159 (1969)
59. MÜLLER, H.E., in: Sonderforschungsbereich 54 "Rheumatoide
Krankheiten des Tieres", Drei-Jahres-Bericht 1972-1974, 237-243
60. PASSOW, H., Effects of Pronase on Passive Ion Permeability
of the Human Red Blood Cell. J.Membrane Biol. 6, 233-258 (1971).
61. RUHENSTROHT-BAUER, G., Persönliche Mitteilung an den Autor.
(unveröffentlichte Befunde)

Herrn Professor Dr. K. Kramer bin ich für die Möglichkeit, an seinem Institut zu arbeiten, zu Dank verpflichtet.

Herrn Professor Dr. H. Schmid - Schönbein danke ich für die Überlassung dieser Arbeit sowie für steten Rat und seine Hilfsbereitschaft, die es mir ermöglichte, diese Arbeit in Aachen fertigzustellen.

Bei Frl. Brandhuber und Frl. Prause möchte ich mich für die Hilfe bei der Durchführung der Versuche, bei Herrn F.J. Kaiser für die Graphik und bei Frl. Stollmann für die Schreifarbeiten bedanken.

LEBENS LAUF

Name: Hans Georg Schachtner

geb. am: 24.1.1944 in Mittenwald, Kreis Garmisch-Partenkirchen

Eltern: Johann Schachtner und Elisabeth, geb. Doppelbauer

Schulbildung:

Volksschule in Kempten/Allgäu von 1950 bis 1955.

Oberrealschule in Kempten von 1955 bis 1964, Abiturabschluß.

Studium:

Pädagogische Hochschule Augsburg von 1964 bis 1967,
mit erfolgreichem Abschluß der 1. Lehramtsprüfung.

Als Lehrer an verschiedenen Volksschulen tätig von
September 1967 bis Oktober 1969.

Studium der Zahnheilkunde an der Universität München
seit Oktober 1969.

Staatsexamen erfolgreich abgeschlossen im Januar 1975.

Zurzeit Wissenschaftl. Mitarbeiter bei der RWTH-Aachen,
in der Abteilung Physiologie der Medizinisch-Theoretischen
Institute.

Aachen, den 25. Februar 1975



